

Studien zur
Flexibilität der Ansamitocin-Biosynthese
in *Actinosynnema pretiosum*

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -
genehmigte Dissertation

von
M. Sc. Tobias Knobloch
geboren am 26.03.1982 in Hannover

2010

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2007 bis April 2010 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Andreas Kirschning am Institut für Organische Chemie der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover angefertigt

Hierdurch erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie eventuell zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben wurden.

Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, den 15.04.2010

Referent: Prof. Dr. A. Kirschning

Korreferent: Prof. Dr. M. Kalesse

Tag der Promotion: 31.05.2010

Zusammenfassung

Tobias Knobloch

Studien zur Flexibilität der Ansamitocin-Biosynthese in *Actinosynnema pretiosum*

Schlagwörter:

Actinosynnema pretiosum – Ansamitocin – Ansamycin – CuAAC – Mutasynthese

Ansamitocine wurden 1977 als Produkte eines Stamms des Actinomyceten *Actinosynnema pretiosum* isoliert. Diese Polyketide werden der aus Pflanzen gewonnenen Naturstofffamilie der Maytansinoiden zugeordnet, weisen eine 19-gliedrige Makrolaktamstruktur auf und differieren insbesondere in der Natur der Esterseitenkette. Strukturell zur Klasse der Ansamycin-Antibiotika gehörend, zeichnen sie sich durch eine hohe zytotoxische Aktivität aus. Während die Wirkstoffentwicklung der Maytansinoide in klinischen Studien der Phase II abgebrochen wurde, erleben sie mittlerweile eine Renaissance als zytotoxische Komponente in Tumor-gerichteten Konjugaten.

In der vorliegenden Dissertation konnten durch Fermentation von in Schlüsselschritten der Ansamitocin-Biosynthese blockierten Mutanten des Stamms *A. pretiosum* ssp. *auranticum* ATCC 31565 biosynthetische Intermediate und bisher unbekannte Produkte wie 7-Desoxyansamitocin-Derivate erzeugt werden. Unter Verwendung der zur Biosynthese des essenziellen Startbausteins 3-Amino-5-hydroxybenzoesäure (AHBA) unfähigen Mutante *A. pretiosum* HGF073 gelang durch Supplementierung von synthetisierten AHBA-Analoga die mutasynthetische Erzeugung von Ansamitocin-Derivaten mit unnatürlichen Veränderungen des arylischen Strukturelements. Das erhaltene Spektrum von Zwischenstufen und Endprodukten der post-PKS-Prozessierung eröffnete tiefere Einblicke in die Substratkompetenzen der beteiligten Enzyme und trug zu einem erweiterten Verständnis der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen bei. Durch Vorläufer-dirigierte Biosynthese mit Alkin- und Azidocarbonsäuren unter Zusatz des stimulierenden Additivs Kokosnusswasser erfolgte die fermentative Darstellung von Ansamitocin-Derivaten mit unnatürlichen Esterseitenketten, die weiterhin zur semisynthetischen Erstellung von Konjugaten mittels Kupfer(I)-katalysierter Alkin-Azid-Zykloaddition (CuAAC, „Click“-Chemie) genutzt wurden. In weiterführenden Studien zum Einfluss des Kokosnusswasser-Additivs konnte eine stimulierende Wirkung von Substanzen mit Phytohormonaktivität auf die Ansamitocin-Produktion durch *A. pretiosum* gezeigt werden. Der Biosynthesemechanismus der auf Modul 3 der Polyketidsynthese stattfindenden, formalen Dien-Migration konnte durch *in silico*-Analysen untersucht und als Dehydratase-Domäne-katalysierte vinyloge *syn*-Dehydratisierung vorgeschlagen werden.

Abstract

Tobias Knobloch

Studies on the Flexibility of Ansamitocin Biosynthesis in *Actinosynnema pretiosum*

Keywords:

Actinosynnema pretiosum – Ansamitocin – Ansamycin – CuAAC – Mutasynthesis

Ansamitocins were first isolated in 1977 as products of a strain of the actinomycete *Actinosynnema pretiosum*. These 19-membered macrocyclic lactam polyketides are classified as belonging to the family of maytansinoids and especially differ in the nature of the ester side-chain. They are structurally related to ansamycin antibiotics and are distinguished by their high cytotoxic activity. While attempts at the clinical development of maytansinoids failed in phase II studies, these compounds currently re-attract interest as cytotoxic components in tumor-directed conjugates.

In this thesis the fermentation of *A. pretiosum* ssp. *auranticum* ATCC 31565 mutants blocked in key steps of ansamitocin biosynthesis led to the generation of biosynthetic intermediates and formerly unknown products, e.g. 7-deoxyansamitocin derivatives. Utilising strain *A. pretiosum* HGF073, a mutant unable to biosynthesise the essential starter unit 3-amino-5-hydroxybenzoic acid (AHBA), supplementation of synthesised AHBA analogues afforded ansamitocin derivatives with unnatural variations of the aromatic moiety. Resulting in a spectrum of intermediates and final products of post-PKS processing, these mutasyntheses gave deeper insights into the substrate competences of the enzymes involved, as well as contributing to an advanced understanding of structure-activity relationships. A precursor-directed biosynthesis approach with alkyne- and azido-carboxylic acids with concomitant addition of the stimulating additive coconut water led to novel ansamitocin derivatives with unnatural ester side-chains. These compounds were subsequently used for the semisynthetic preparation of conjugates using copper(I)-catalysed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC, “click” chemistry). Further investigations towards the influence of the additive coconut water revealed a stimulating effect of compounds with phytohormone activity on ansamitocin production by *A. pretiosum*. The biosynthetic mechanism for the formal diene migration on module 3 of the ansamitocin polyketide synthase was investigated by *in silico*-analysis and could be proposed as occurring *via* dehydratase domain-catalysed vinylogous *syn*-dehydratisation.

Inhaltsverzeichnis

1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	1
2	EINLEITUNG.....	4
2.1	ANSAMITOCINE UND MAYTANSINOIDE.....	4
2.2	VORLÄUFER-DIRIGIERTE BIOSYNTHESE UND MUTASYNTHESE.....	9
2.3	ANSAMITOCIN-BIOSYNTHESE IN <i>ACTINOSYNNEMA PRETIOSUM</i>	11
3	ZIELSETZUNG.....	16
3.1	WEGE ZU ANSAMITOCIN-DERIVATEN.....	16
3.2	STUDIEN ZUM MECHANISMUS DER DIEN-MIGRATION.....	19
4	BESCHREIBUNG UND DISKUSSION DER ERGEBNISSE	20
4.1	WEGE ZU ANSAMITOCIN-DERIVATEN.....	20
4.1.1	<i>Mutasyntese von Proansamitocin-Derivaten.....</i>	<i>20</i>
4.1.1.1	Vorarbeiten.....	20
4.1.1.2	Fermentation.....	21
4.1.1.3	Erhaltene Proansamitocin-Derivate.....	25
4.1.1.4	Mutasyntetische Biotransformation.....	29
4.1.1.5	Biologische Aktivitäten.....	32
4.1.2	<i>Mutasyntetische Derivatisierungen mit AHBA-Derivaten.....</i>	<i>34</i>
4.1.2.1	Vorarbeiten.....	35
4.1.2.2	Syntese der Mutasynthone.....	36
4.1.2.3	Verfütterungen	42
4.1.2.3.1	Grundlegendes zu Mutasyntesen	43
4.1.2.3.2	Ergebnisse der Mutasynteseversuche.....	47
4.1.2.4	Biologische Aktivitäten.....	56
4.1.3	<i>Mutasyntesen unter Esterseitenkettendirigierung</i>	<i>58</i>
4.1.3.1	Eingehende Betrachtungen.....	58
4.1.3.2	Ergebnisse der Mutasynteseversuche	61
4.1.3.3	Biologische Aktivitäten.....	71
4.1.4	<i>Studien zum Einfluss von Phytohormonen auf A. pretiosum</i>	<i>73</i>
4.1.4.1	Eingehende Betrachtungen.....	73
4.1.4.2	Ergebnisse der Mutasynteseversuche	74
4.1.5	<i>Vorarbeiten zur chemoenzymatischen Derivatisierung von Proansamitocin-Derivaten</i>	<i>78</i>
4.1.5.1	Vorarbeiten.....	79

4.1.5.2	Fermentative Darstellung von Substraten	80
4.1.5.3	Synthese von aktivierten Acyl-Cosubstraten.....	82
4.1.6	<i>Semisynthetische „Click“-Derivatisierungen</i>	84
4.1.6.1	Vorarbeiten.....	85
4.1.6.2	Synthese der Azidoverbindungen.....	87
4.1.6.3	„Click“-Synthesen mit Ansamitocin-Derivaten	89
4.1.6.4	Biologische Aktivitäten.....	95
4.2	STUDIEN ZUM MECHANISMUS DER DIEN-MIGRATION.....	96
4.2.1	<i>Vorarbeiten</i>	96
4.2.2	<i>Ergebnisse der Analysen</i>	97
5	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	102
5.1	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	102
5.2	AUSBLICK.....	104
6	EXPERIMENTELLER TEIL.....	107
6.1	ALLGEMEINE HINWEISE ZU CHEMISCH-SYNTHETISCHEN ARBEITEN.....	107
6.2	ALLGEMEINE HINWEISE ZUR ARBEIT MIT <i>A. PRETIOSUM</i> -STÄMMEN.....	111
6.3	MUTASYNTHESEN AUS KAPITEL 4.1.1	114
6.4	SYNTHESE DER VERBINDUNGEN AUS KAPITEL 4.1.2	124
6.5	MUTASYNTHESEN AUS KAPITEL 4.1.2	136
6.6	SYNTHESE DER VERBINDUNGEN AUS KAPITEL 4.1.3	158
6.7	MUTASYNTHESEN AUS KAPITEL 4.1.3	162
6.8	MUTASYNTHESEN AUS KAPITEL 4.1.4	172
6.9	SYNTHESE DER VERBINDUNGEN AUS KAPITEL 4.1.5	173
6.10	MUTASYNTHESEN AUS KAPITEL 4.1.5	186
6.11	SYNTHESE DER VERBINDUNGEN AUS KAPITEL 4.1.6	190
6.12	BIOINFORMATIKSTUDIEN AUS KAPITEL 4.2	204
7	ANHANG.....	205
7.1	QUANTIFIZIERUNG DURCH ANALYTISCHE HPLC	205
7.2	NMR-SPEKTREN	206

1 Abkürzungsverzeichnis

μ	mikro
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
A	Alanin
a	atto (10^{-18})
ABA	Abscisinsäure
Ac	Acetyl
ACP	Acyl Carrier Protein
AHBA	3-Amino-5-hydroxybenzoesäure
AP-#	Ansamitocin P-#
Äq.	Äquivalent
aq.	wässrig
Ar	Aryl
<i>Asm</i>	Enzyme der Ansamitocin-Biosynthese in <i>Actinosynnema pretiosum</i>
<i>asm</i>	Gene der Ansamitocin-Biosynthese in <i>Actinosynnema pretiosum</i>
AT	Acyltransferase
ATP	Adenosintriphosphat
ber.	berechnet
BnAP	<i>N</i> ⁶ -Benzylaminpurin / <i>N</i> ⁶ -Benzyladenin
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
c	Konzentration
CoA	Coenzym A
COSY	correlation spectroscopy
CuAAC	Kupfer-katalysierte Alkin-Azid-Zykloaddition
Cys	Cystein
D	Asparaginsäure
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DEPT	distorsionless enhancement by polarisation transfer
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DME	1,2-Dimethoxyethan
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>engl.</i> deoxyribonucleic acid
DTT	DL-1,4-Dithiothreitol
EDC*HCl	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-Hydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EE	Ethylacetat
ER	Enoylreduktase
ESI	electrospray ionisation
<i>et al.</i>	<i>lat.</i> et alii
Et	Ethyl
f	femto (10^{-15})
FA	Ameisensäure
FAS	Fettsäuresynthase

G	Glycin
g	Gramm
GA	Gibberellinsäure A ₃
gef.	gefunden
Glu	Glutaminsäure
H	Histidin
h	Stunde
HMBC	<i>engl.</i> heteronuclear multiple bond correlation
HMQC	<i>engl.</i> heteronuclear multiple quantum coherence
HPLC	<i>engl.</i> high performance liquid chromatography
HRMS	<i>engl.</i> high resolution mass spectrometry
HSNAc	N-Acetylcysteamin
Hsp90	<i>engl.</i> heat shock protein 90
HSQC	<i>engl.</i> heteronuclear single quantum coherence
HZI	Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung
IAA	Indol-3-essigsäure
IBA	Indol-3-buttersäure
IC	<i>engl.</i> inhibitory concentration
<i>J</i>	skalare Kopplungskonstante
kat.	katalytisch
KIN	Kinetin
konz.	konzentriert
KR	Ketoreduktase
KS	Ketosynthase
L	Leucin
L	Liter
m	milli
M	molar
Me	Methyl
min	Minute
MJ	Methyljasmonat
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
N	Asparagin
n	nano
NAD/NADH	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (oxidierte/reduzierte Form)
NDP	Nucleotidylldiphosphat
NMR	<i>engl.</i> nuclear magnetic resonance
nOe	<i>engl.</i> nuclear OVERHAUSER effect
NRPS	nicht-ribosomale Peptidsynthetase
p	pico (10 ⁻¹²)
P	Prolin
PDB	<i>engl.</i> precursor-directed biosynthesis
PE	Petrolether
Ph	Phenyl
PKS	Polyketidsynthase
ppm	<i>engl.</i> parts per million
Pr	Propyl
Q	Glutamin
quant.	quantitativ
R	Arginin

RNA	<i>engl.</i> ribonucleic acid
rpm	<i>engl.</i> rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SAR	<i>engl.</i> structure-activity relationship
Smp.	Schmelzpunkt
SNAc	<i>N</i> -Acetylcysteaminyl
TE	Thioesterase
Teoc	2-(Trimethylsilyl)ethoxycarbonyl
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
t_R	Retentionszeit
UDP	Uridyldiphosphat
UPLC	<i>engl.</i> ultra performance liquid chromatography
UV	ultraviolett
W	Tryptophan
YMG	<i>engl.</i> yeast, malt, glucose
ZEA	Zeatin
δ	chemische Verschiebung
Δ	Erhitzen bis zum Rückfluss
Δ^x	Doppelbindung an C-X
λ	Wellenlänge

2 Einleitung

„The synthetic chemist who is developing a useful drug has two objectives: to make it more efficiently, and to synthesize, by minor structural alterations, analogues which may have more useful properties. I wish to examine here the question whether the chemist can, in principle, manipulate the processes of production of antibiotics by fungi with the same objectives in view.” – A. J. BIRCH, 1963.¹

Trotz ihres Alters von mittlerweile fast einem halben Jahrhundert hat die Aussage von BIRCH auch heute nicht ihre Relevanz verloren. In der Tat kann der zitierte Artikel in seinen Grundlagen als Konzeptschrift für die vorliegende Arbeit gesehen werden und soll im Rahmen dieser einleitenden Abschnitte gewürdigt werden. Während BIRCH sich auf Organismen aus dem Reich der Pilze bezieht, wird in dieser Arbeit ein zur Gruppe der Actinomyceten (Ordnung *Actinomycetales*) gehörendes Bakterium betrachtet.

2.1 Ansamitocine und Maytansinoide

Der zunächst zum Genus *Nocardia*,² später jedoch unter *Actinosynnema pretiosum* subsp. *pretiosum* klassifizierte Stamm³ wurde 1975 in Japan vom Blatt einer Segge (*Carex* sp.) isoliert.⁴ Aus der Fermentationsbrühe dieses Stamms gelang Forschern der TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD. die Isolierung von Verbindungen mit starker Antitumoraktivität.^{2,5} Diese als Ansamitocine bezeichneten 19-gliedrigen Makrolaktame konnten in Form einer Gruppe von Verbindungen isoliert werden, deren Mitglieder sich in der Natur der Esterseitenkette unterschieden (Abbildung 1). Insbesondere Ansamitocin P-3 **1c** (AP-3) und P-4 **1e** (AP-4) traten als Hauptkomponenten der Fermentation auf.

¹ A. J. Birch, *Pure Appl. Chem.* **1963**, 7, 527.

² E. Higashide, M. Asai, K. Ootsu, S. Tanida, Y. Kozai, T. Hasegawa, T. Kishi, Y. Sugino, M. Yoneda, *Nature* **1977**, 270, 721-722.

³ ATCC 31280.

⁴ T. Hasegawa, S. Tanida, K. Hatano, E. Higashide, M. Yoneda, *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1983**, 33, 314-320.

⁵ M. Asai, E. Mizuta, M. Izawa, K. Haibara, T. Kishi, *Tetrahedron* **1979**, 35, 1079-1085.

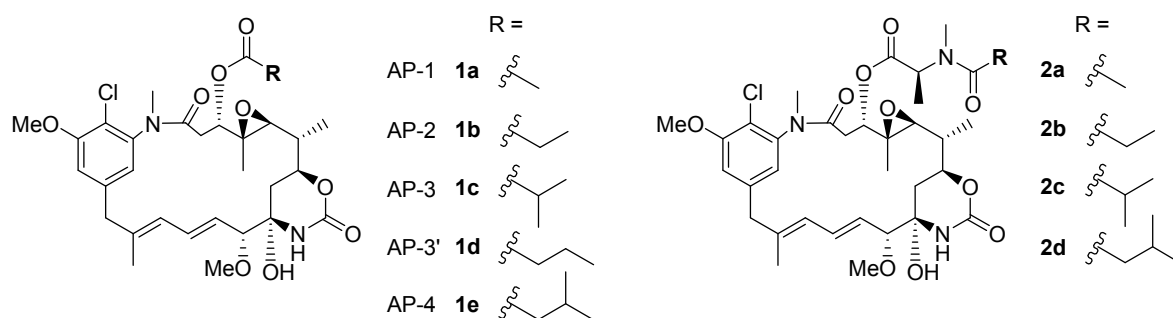


Abbildung 1: Aus *A. pretiosum* isolierte Ansamitocine (AP-#, **1a-e**) im Vergleich zu einer Auswahl von aus pflanzlichem Material isolierten Maytansinoiden (Maytansin **2a**, Maytanprin **2b**, Maytanbutin **2c**, Maytanvalin **2d**).

In Studien an Mäusen zeigten diese Verbindungen exzellente Antitumorwirkungen gegenüber P388-Mausleukämietumoren unter Applizierung in täglichen Dosen von nur 0.8-25 µg/kg. Weiterhin konnte die Arretierung der Zellteilung von Tumorzellen *in vitro* beobachtet werden, ebenso wie die Verhinderung der Polymerisation von isoliertem Tubulin. Sowohl die gezeigte antimittotische Aktivität, als auch die Struktur der Ansamitocine erinnerte an Verbindungen, die aus früheren Studien bekannt waren. Bereits 1972 hatten KUPCHAN *et al.* die Isolierung von Maytansin **2a** aus dem äthiopischen Strauch *Maytenus serrata* beschrieben.⁶ Die Aufklärung der Struktur und Stereochemie gelang durch Röntgenstrukturanalyse eines 9-(3-Brompropyl)-Derivats. In der Folge wurden vergleichbare und allgemein als Maytansinoide bezeichnete Naturstoffe auch aus anderen Pflanzen isoliert.⁷ Im Gegensatz zu Ansamitocinen wiesen die aus pflanzlichem Material isolierten Verbindungen üblicherweise *N*-acylierte und *N*-methylierte L-Alanoyl-Esterseitenketten auf (Abbildung 1). Allerdings konnte mit dem als Maytanacin **1a** bezeichneten Naturstoff auch eine Verbindung isoliert werden, die identisch mit AP-1 **1a** ist.^{7c} Da einerseits bisher nicht nachgewiesen werden konnte, dass Pflanzenzellen zur Biosynthese von Maytansinoiden fähig sind, andererseits aber auch keine Verbindungen mit entsprechender Esterseitenkette aus

⁶ S. M. Kupchan, Y. Komoda, W. A. Court, G. J. Thomas, R. M. Smith, A. Karim, C. J. Gilmor, R. C. Haltiwanger, R. F. Bryan, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 1354-1356.

⁷ a) S. M. Kupchan, Y. Komoda, G. J. Thomas, H. P. Hintz, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1972**, 1065; b) M. W. Wani, H. L. Taylor, M. E. Wall, *Chem. Commun.* **1973**, 390; c) S. M. Kupchan, A. R. Branfman, A. T. Sneden, A. K. Verma, R. G. Dailey, Jr., Y. Komoda, Y. Nagao, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 5294-5295; d) S. M. Kupchan, Y. Komoda, A. R. Branfman, A. T. Sneden, W. A. Court, G. J. Thomas, H. P. J. Hintz, R. M. Smith, A. Karim, G. A. Howie, A. K. Verma, Y. Nagao, R. G. Dailey, Jr., V. A. Zimmerly, W. C. Sumner, Jr., *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 2349-2357; e) K. Sakai, T. Ichikawa, K. Yamada, M. Yamashita, M. Tanimoto, A. Hikita, Y. Ijuin, K. Kondo, *J. Nat. Prod.* **1988**, *51*, 845-850.

bakteriellen Produzentenstämmen isoliert werden konnten,⁸ wird eine symbiotische Beziehung zwischen diesen Partnern diskutiert.⁹

Bedingt durch ihre hohe Antitumoraktivität haben Maytansinoide und Ansamitocine seit ihrer Entdeckung große Beachtung gefunden. Insofern sei an dieser Stelle für einen umfassenden Überblick insbesondere auf den Übersichtsartikel von CASSADY, CHAN, FLOSS und LEISTNER verwiesen.⁸ Während der Mechanismus ihrer antimitotischen Aktivität als Bindung an β -Tubulineinheiten ähnlich der Vinca-Alkaloide und des Makrolids Rhizoxin ermittelt wurde,¹⁰ konnten auch Einsichten in die Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (*engl. structure-activity-relationship, SAR*) dieser Verbindungen gewonnen werden (Abbildung 2).

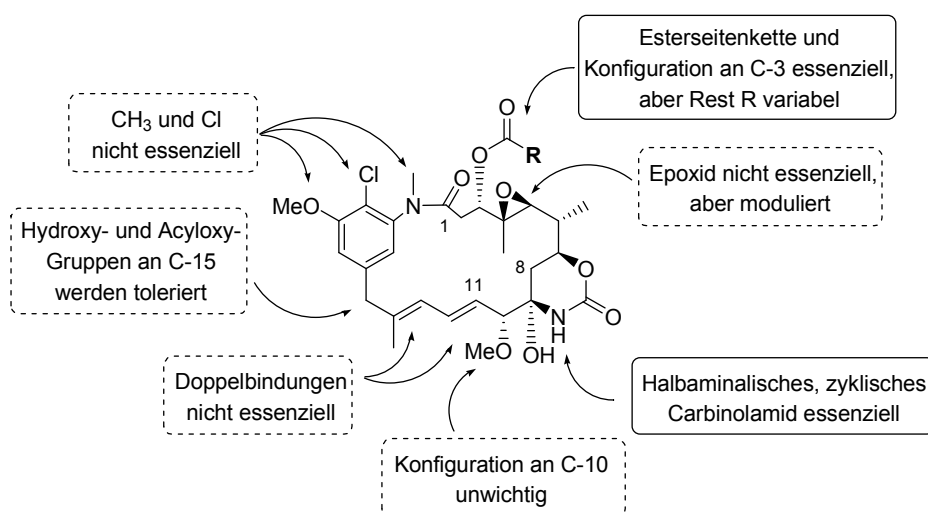


Abbildung 2: Struktur-Aktivitäts-Beziehungen der Maytansinoide (modifiziert nach CASSADY *et al.*).⁸

Hierzu trugen vor allem die natürlich auftretenden Derivate sowie hieraus durch chemische und biologische Transformationen generierte Verbindungen bei. Diese semisynthetischen Ansätze waren allerdings auf bestimmte Veränderungen beschränkt, so dass vor allem an Heteroatome gebundene Substituenten variiert wurden, während die Grundstruktur des Makrolaktams nicht verändert werden konnte. Obwohl die Klasse der Maytansinoide auch durch totalsynthetische Ansätze bearbeitet wurde, konnten diese nicht zu einem tieferen Verständnis ihrer biologischen Aktivität beitragen.¹¹

⁸ J. M. Cassady, K. K. Chan, H. G. Floss, E. Leistner, *Chem. Pharm. Bull.* **2004**, 52, 1-26, und darin angegebene Referenzen.

⁹ C. B. Pullen, P. Schmitz, D. Hoffmann, K. Meurer, T. Boetcher, D. von Bamberg, A. M. Pereira, S. de Castro Franca, M. Hauser, H. Geertsema, A. van Wyk, T. Mahmud, H. G. Floss, E. Leistner, *Phytochemistry* **2003**, 62, 377-387.

¹⁰ E. Hamel, *Pharmacol. Therap.* **1992**, 55, 31-51.

¹¹ Einen umfassenden Überblick zu diesen Studien gibt: A. Kirschning, K. Harmrolfs, T. Knobloch, *C. R. Chimie* **2008**, 11, 1523-1543.

Als essenziell für die Aktivität der Maytansinoide konnte die Anwesenheit des Carbinolamids in der zyklisierten Halbaminallform sowie die Präsenz der Esterseitenkette ermittelt werden. Wie bereits an der vergleichbar hohen Aktivität von Ansamitocinen und „pflanzlichen“ Maytansinoiden zu erahnen war, zeigte sich eine große Toleranz gegenüber der Natur der Esterseitenkette.¹²

Die Entwicklung von Maytansin **2a** zu einem therapeutisch einsetzbaren Wirkstoff scheiterte in klinischen Studien der Phase II.⁸ In erfolgversprechenden präklinischen und klinischen Studien der Phase I war zunächst eine Dosis-limitierende Toxizität im Bereich von 1-2 mg/m² ermittelt worden, die mit neurotoxischen Nebenwirkungen und gastrointestinaler Toxizität einherging. Während hierbei einige Patienten positive Reaktionen auf die Behandlung zeigten, konnte dies in den breiter angelegten Studien der Phase II nur in wenigen Fällen gezeigt werden.

Jedoch erleben maytansinoide Antitumorwirkstoffe mittlerweile eine Renaissance als Wirkkomponente in Tumor-gerichteten Konjugaten.¹³ Hierbei wird die zytotoxische Komponente typischerweise über eine Disulfidbrücke mit einem gegen Tumor-spezifische Antigene gerichteten Antikörper, oder aber einem durch bestimmte Tumorarten bevorzugt aufgenommenen Liganden wie Folsäure verbunden (Schema 1).¹⁴ Nach Endozytose kann daraufhin im reduzierenden intrazellulären Milieu der Zelle eine Spaltung der Disulfidbrücke mit einhergehender Freisetzung des zytotoxischen Wirkstoffs erfolgen.¹⁵ Auf Basis dieses zielgerichteten Prinzips ist eine geringere Dosierung des Wirkstoffs für die Therapie von Patienten möglich, so dass Dosis-abhängige Nebenwirkungen reduziert werden können.

Die Erzeugung von zur Konjugatbildung geeigneten maytansinoiden Komponenten wurde vor allem von IMMUNOGEN INC. verfolgt. Das Verfahren fußt auf der semisynthetischen

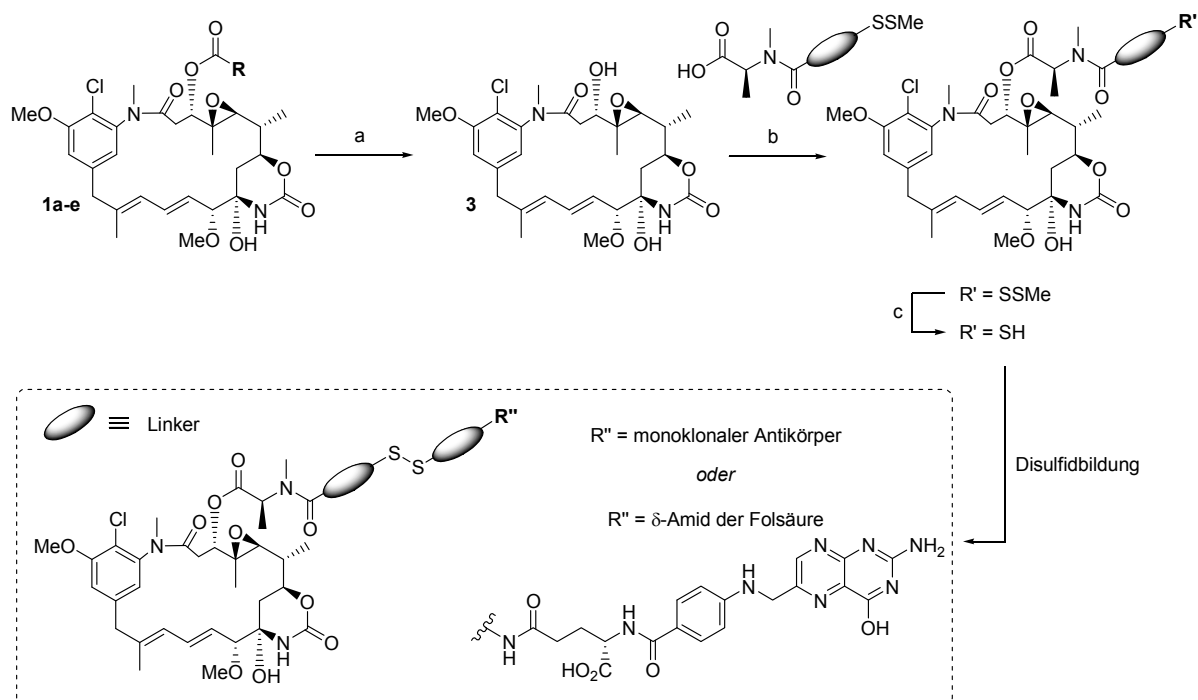
¹² S. M. Kupchan, A. T. Sneden, A. R. Branfman, G. A. Howie, L. I. Rebhun, W. E. McIvor, R. W. Wang, T. C. Schnaitman, *J. Med. Chem.* **1978**, *21*, 31-37.

¹³ a) Y. V. Kovtun, C. A. Audette, M. F. Mayo, G. E. Jones, H. Doherty, E. K. Maloney, H. K. Erickson, X. Sun, S. Wilhelm, O. Ab, K. C. Lai, W. C. Widdison, B. Kellog, H. Johnson, J. Pinkas, R. J. Lutz, R. Singh, V. S. Goldmacher, R. V. Chari, *Cancer Res.* **2010**, *70*, 2528-2537; b) R. V. J. Chari, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 98-107; c) H. K. Erickson, P. U. Park, W. C. Widdison, Y. V. Kovtun, L. M. Garrett, K. Hoffman, R. J. Lutz, V. S. Goldmacher, W. A. Blättler, *Cancer Res.* **2006**, *66*, 4426-4433; d) Y. V. Kovtun, C. A. Audette, Y. Ye, H. Xie, M. F. Ruberti, S. J. Phinney, B. A. Leece, T. Chittenden, W. A. Blättler, V. S. Goldmacher, *Cancer Res.* **2006**, *66*, 3214-3221; e) H. Xie, C. Audette, M. Hoffee, J. M. Lambert, W. A. Blättler, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2004**, *308*, 1073-1082; f) Liu, B. M. Tadayoni, L. A. Bourret, K. M. Mattocks, S. M. Deer, W. C. Widdison, N. L. Kedersha, P. D. Ariniello, V. S. Goldmacher, J. M. Lambert, W. A. Blättler, R. V. J. Chari, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 8618-8623.

¹⁴ a) J. A. Reddy, E. Westrick, H. K. R. Santhapuram, S. J. Howard, M. L. Miller, M. Vetzal, I. Vlahov, R. V. J. Chari, V. S. Goldmacher, C. P. Leamon, *Cancer Res.* **2007**, *67*, 6376-6382; b) C. A. Ladino, R. V. J. Chari, L. A. Bourret, N. L. Kedersha, V. S. Goldmacher, *Int. J. Cancer* **1997**, *73*, 859-864.

¹⁵ H. K. Erickson, W. C. Widdison, M. F. Mayo, K. Whiteman, C. Audette, S. D. Wilhelm, R. Singh, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 84-92.

Modifizierung von fermentativ über *A. pretiosum* gewonnenen Ansamitocinen.¹⁶ In Ausnutzung der bekannten Struktur-Aktivitäts-Beziehungen wird die Esterseitenkette in einen verknüpfenden Linker für die Anbindung der Tumor-adressierten Komponente umgewandelt (Schema 1). Hierbei erfolgt zunächst eine reduktive Abspaltung der natürlichen Esterseitenketten, woraufhin Maytansinol **3** erneut verestert wird. Nach reduktiver Freisetzung der eingeführten Thiolfunktion kann eine Konjugatbildung erfolgen.



Schema 1: Semisynthetische Transformationen ausgehend von Ansamitocinen zur Einführung einer reaktiven Thiol-Funktion zwecks Aufbau von Tumor-gerichteten Konjugaten. Bedingungen (nach WIDDISON *et al.*):¹⁶ a) $\text{LiAlH}(\text{OMe})_3$, THF, $-30 \rightarrow -40^\circ\text{C}$, dann pH = 12, 30 min, 81 %; b) DCC, ZnCl_2 , CH_2Cl_2 , RT, 32-36 % (+D-Alanoyl-Diastereomer); c) DTT, EtOAc:MeOH:Phosphatpuffer(pH = 7.5) = 1:1:1, RT, 97 %.

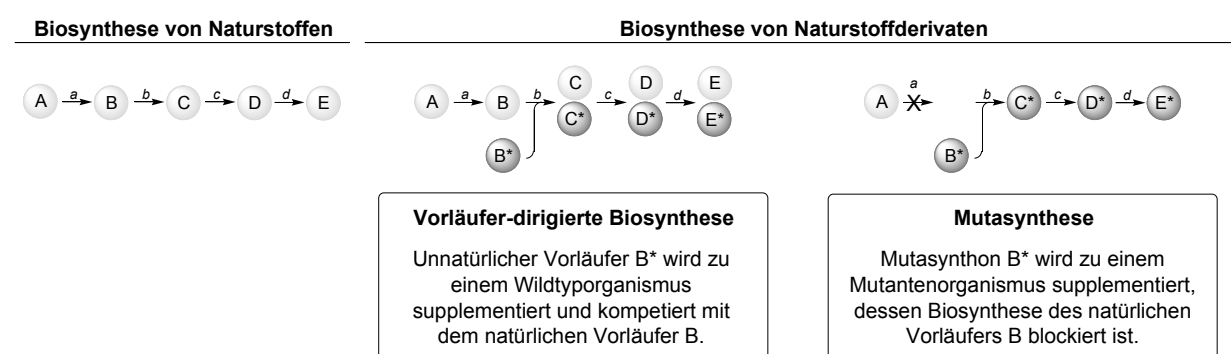
Ausgehend von den natürlichen Produkten der Ansamitocin-Biosynthese in *A. pretiosum* erfordert dieses Verfahren drei semisynthetische Schritte für die Einführung einer einzigen weiter zu nutzenden chemischen Funktionalität. Könnte eine zur Konjugatbildung nutzbare Funktionalität bereits im Rahmen der Biosynthese eingeführt werden, so dass nur ein einziger semisynthetischer Schritt nötig wäre? Hierfür müsste die möglicherweise vorhandene Substratflexibilität der entsprechenden Biosyntheseschritte ausgenutzt werden, wobei

¹⁶ W. C. Widdison, S. D. Wilhelm, E. E. Cavanagh, K. R. Whiteman, B. A. Leece, Y. Kovtun, V. S. Goldmacher, H. Xie, R. M. Steeves, R. J. Lutz, R. Zhao, L. Wang, W. A. Blättler, R. V. J. Chari, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 4392-4408.

zunächst erörtert werden muss, wie von außen ein Einfluss auf die Biosynthese eines Naturstoffs ausgeübt werden kann.

2.2 Vorläufer-dirigierte Biosynthese und Mutasyntese

Der älteste und konzeptionell einfachste Ansatz zur Beeinflussung der Biosynthese eines Sekundärmetaboliten beruht auf der Zugabe von bekannten oder potenziellen Biosynthesevorläufern zu Kulturen der entsprechenden Mikroorganismen. Dieses Konzept der Vorläufer-dirigierten Biosynthese (*engl. precursor-directed biosynthesis*, PDB) wurde bereits von BIRCH umfangreich diskutiert (Schema 2).^{1,17}



Schema 2: Stilisierte Biosynthese von Naturstoffen: Allgemeine Ansätze zur Generierung neuer Analoga durch Ausnutzung der inhärenten biosynthetischen Potenziale.

Sollten exogen hinzugefügte Vorläufer aufgenommen und gegebenenfalls intrazellulär aktiviert werden sowie daraufhin in den gewünschten Biosyntheseweg einfließen und in ausreichender Weise prozessiert werden, können veränderte Naturstoffe erhalten werden. Grundsätzlich kompetieren jedoch die hinzugegebenen Vorläufer mit den intern vorhandenen Bausteinen um die biosynthetische Prozessierung. Dies resultiert üblicherweise in Produktgemischen, die oft mit Problemen bei der Trennung und Isolierung der Komponenten verbunden sind. Insbesondere von unnatürlich modifizierten Bausteinen ist eine weniger effiziente Prozessierung als die ihrer natürlichen Gegenstücke zu erwarten. Unter den kompetitiven Bedingungen des PDB-Ansatzes können deshalb häufig nur geringe Ausbeuten an gewünschten Naturstoffderivaten erzielt werden.

¹⁷ Eine Übersicht gibt: R. Thiericke, J. Rohr, *Nat. Prod. Rep.* **1993**, 10, 265-289.

Eine Eliminierung dieser Vorläuferkonkurrenz kann prinzipiell durch mutative Inaktivierung der natürlichen Baustein-Zulieferung erfolgen, woraufhin durch Zugabe eines entsprechenden, gegebenenfalls veränderten Vorläufers (Mutasynton) eine chemische Komplementation der Mutation erreicht werden kann (Schema 2). Während diese Methode bereits 1963 von BIRCH vorgeschlagen wurde,¹ fand die Prägung des gebräuchlichen Begriffs der Mutasynthese erst im Jahr 1977 durch RINEHART statt.¹⁸ Grundsätzlich hat die Methode mit Fortschritten in Gensequenzierungsverfahren und der Entwicklung von molekularbiologischen Werkzeugen zur zielgerichteten Einführung von Mutationen an Bedeutung gewonnen. An dieser Stelle sei auf die umfangreiche Übersichtsliteratur zur Mutasynthese verwiesen, welche die zahlreichen Beispiele erfolgreicher Mutasynthesen in gebührender Weise würdigt.¹⁹ Prinzipiell kann die Mutasynthese einen synthetischen Zugang zu Bibliotheken von Naturstoffderivaten bieten,²⁰ die über PDB-Ansätze nicht oder nur unter großen Schwierigkeiten zu realisieren wären. Weiterhin können die erzeugten Mutaprodukte für fortgeschrittene Studien zu Struktur-Aktivitäts-Beziehungen genutzt werden, sofern strukturelle Veränderungen eingeführt werden können, die nicht durch semisynthetische Methoden zugänglich sind. Während totalsynthetische Verfahren jedes beliebige Derivat hervorbringen können, spricht damit aufgrund der komplexen Strukturen vieler Naturstoffe verbundene, hohe Aufwand gegen ihre Anwendung zur Erzeugung entsprechender Substanzbibliotheken.

Die mutative Ausschaltung der Biosynthese eines Zielvorläufers kann allerdings nur erfolgen, wenn dieser nicht für primärmetabolische Abläufe essenziell ist. Liegen zudem viele ähnliche potenzielle Substrate in einem Organismus vor, und ist die Bioaktivität des Endprodukts von der Wahl eines bestimmten Vorläufers abhängig, so muss die Spezifität des Auswahlsschritts hoch sein. Weist das für einen bestimmten Biosyntheseweg verwendete Substrat hingegen charakteristische Strukturmerkmale auf, ist die Notwendigkeit zur hohen Spezifität nicht gegeben. In diesem Fall ist die Wahrscheinlichkeit einer großen Flexibilität dieses ersten Schritts gegeben, was zunächst als erfolgversprechende Prognose für mutasynthetische Studien anzusehen ist. Hierbei muss natürlich bedacht werden, dass die Akzeptanz eines

¹⁸ K. L. Rinehart, Jr., *Pure Appl. Chem.* **1977**, *49*, 1361-1384.

¹⁹ a) A. Kirschning, F. Taft, T. Knobloch, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, 3245-3295; b) J. Kennedy, *Nat. Prod. Rep.* **2008**, *25*, 25-34; c) S. Weist, R. D. Süssmuth, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *68*, 141-150.

²⁰ Eine Auswahl zeitgenössischer Literatur: a) R. J. M. Goss, S. Lanceron, A. D. Roy, S. Sprague, M. Nur-e-Alam, D. L. Hughes, B. Wilkinson, S. J. Moss, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 698-702; b) D. Ulanova, J. Novotná, Y. Smutná, Z. Kameník, R. Gažák, M. Šulc, P. Sedmera, S. Kadlčík, K. Plháčková, J. Janata, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 927-930; c) L. Heide, *Biotech. Adv.* **2009**, *27*, 1006-1014; d) M. Nett, B. S. Moore, *Pure Appl. Chem.* **2009**, *81*, 1075-1084; e) S. Eichner, H. G. Floss, F. Sasse, A. Kirschning *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1801-1805; f) Y. Xu, E. M. K. Wijeratne, P. Espinosa-Artiles, A. A. L. Gunatilaka, I. Molnár, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 345-354; g) S. Gupta, V. Lakshmanan, B. S. Kim, R. Fecik, K. A. Reynolds, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1609-1616.

analogen Substrats und seine Prozessierung zu einem Naturstoffderivat stets das Resultat des kleinsten gemeinsamen Nenners der Substratkompetenz aller notwendigen Schritte ist.

2.3 Ansamitocin-Biosynthese in *Actinosynnema pretiosum*

Die makrolaktamische Struktur der Maytansinoide, die ein aromatisches System beherbergt, das an zwei nicht nebeneinander liegenden Positionen durch eine aliphatische Kette verknüpft ist, hatte sie als zur Gruppe der Ansamycin-Antibiotika angehörig klassifiziert (lat. *ansa* = Henkel).²¹ Zu dieser Klasse gehören auch so bekannte und pharmakologisch bedeutsame Substanzen wie Rifamycin B **4**²² und Geldanamycin **5** (Abbildung 3).²³

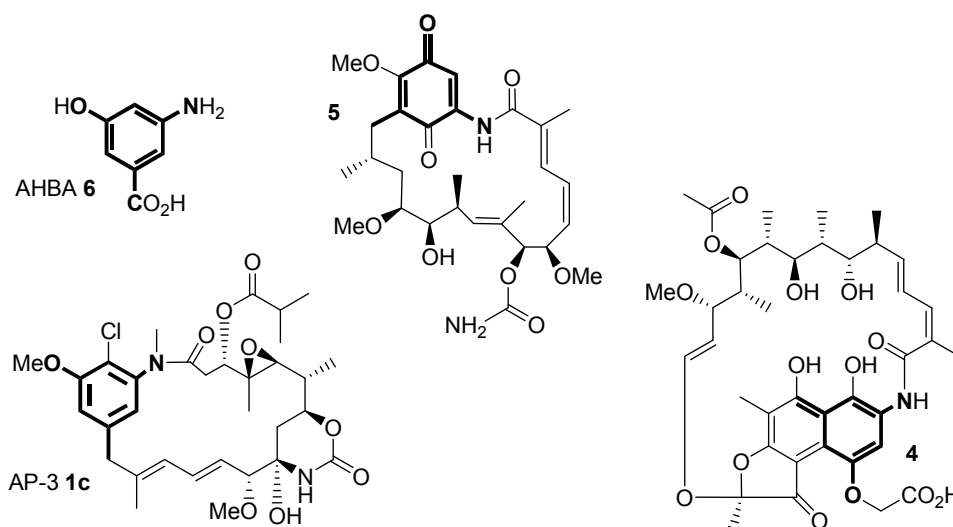


Abbildung 3: Die Ansamycine Ansamitocin P-3 **1c**, Geldanamycin **5** und Rifamycin B **4** im Vergleich zu ihrem gemeinsamen biosynthetischen Vorläufer 3-Amino-5-hydroxybenzoesäure (AHBA) **6**.

Während der Inhibitor der bakteriellen DNA-abhängigen RNA-Polymerase Rifamycin B **4** in der semisynthetischen Form des Derivats Rifampicin zur Behandlung mycobakterieller Infektionen wie Tuberkulose (*Mycobacterium tuberculosis*) und Lepra (*M. leprae*) eingesetzt wird, ist in den letzten Jahren der Wirkstoffentwicklung des Zytostatikums Geldanamycin große Aufmerksamkeit zuteil geworden. Mehrere semisynthetische Derivate dieses Inhibitors

²¹ S. Funayama, G. A. Cordell, *Ansamycin Antibiotics discovery, classification, biosynthesis and biological activities*, In *Studies in Natural Products Chemistry*, Vol. 23, Atta-ur-Rahman (Hrsg.), Elsevier Science B. V. **2000**, 51-106.

²² H. G. Floss, T.-W. Yu, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 621-632.

²³ a) C. DeBoer, P. A. Meulman, R. J. Wnuk, D. H. Peterson, *J. Antibiot.* **1970**, *23*, 440-447; b) Y. Fukuyo, C. R. Hunt, N. Horikoshi, *Cancer Lett.* **2010**, *290*, 24-35.

des Hsp90-Chaperons in Säugerzellen befinden sich zur Zeit in klinischen Studien zur Krebstherapie.²⁴

Abgesehen von gemeinsamen Strukturmerkmalen lassen sich Ansamycine durch besondere Charakteristika ihrer Biosynthese definieren. So ist der Initiationsbaustein ihrer Biosynthese ein speziell für diese Stoffwechselwege synthetisiertes mC_7N -Substrat: 3-Amino-5-hydroxybenzoesäure (AHBA) **6** (Abbildung 3). Das Gen des in die Biosynthese dieses Vorläufers involvierten Enzyms AHBA-Synthase war aus dem Rifamycin-Produzenten *Amycolatopsis mediterranei* S669 bekannt und konnte vom Arbeitskreis FLOSS als Sonde zur Lokalisierung des Ansamitocin-Biosynthesegenclusters in *Actinosynnema pretiosum* subsp. *auranticum* ATCC 31565 genutzt werden.²⁵ Dieser Stamm war aus einem weiteren Isolat von Forschern der TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD. hervorgegangen, dessen vegetatives Mycel vor allem durch eine orange Pigmentierung vom blass-gelblichen Erscheinungsbild des einleitend erwähnten Stamms abwich,⁴ und das nach Mutagenese mit Ethidiumbromid große Mengen von Ansamitocinen produzierte.²⁶

Die umfangreichen Arbeiten von FLOSS und Mitarbeitern führten zu einem vollständig sequenzierten und größtenteils annotierten Ansamitocin-Gencluster.²⁵ Begleitet von der Erstellung einer Vielzahl von Funktionsmutanten konnten weite Teile der Ansamitocin-Biosynthese aufgeklärt werden (Schema 3).⁸

Die Biosynthese des Initiationsbausteins AHBA **6** erfolgt ausgehend von UDP-Glukose über eine Variante der Shikimisäurebiosynthese.²⁷ Die weitere Prozessierung wird durch den großen Multienzymkomplex einer bakteriellen, modularen Polyketidsynthase (PKS, Typ I) katalysiert.²⁸ Diese in ihren Grundzügen an Fettsäuresynthasen aus Vertebraten erinnernde Architektur besteht aus katalytisch aktiven Domänen, welche wiederum in Module organisiert sind. Neben einem Lademodul, das der Einführung des Initiationsbausteins in die Produktionslinie der PKS dient, legt die Abfolge und katalytische Ausstattung der Elongationsmodule den Aufbau des Polyketids fest. Im Gegensatz zu vergleichbaren PKS-Systemen des Typs I muss der Initiationsbaustein der Ansamitocin-PKS (*AsmPKS*) nicht als Coenzym A-(CoA)-aktivierter Thioester vorliegen. Die *AsmPKS* weist ein an nicht-ribosomale Peptidsynthetasen (NRPS) erinnerndes Lademodul auf, dessen Adenylierungs-

²⁴ Eine Übersicht bieten; a) J. R. Porter, J. Ge, J. Lee, E. Normant, K. West, *Curr. Top. Med. Chem.* **2009**, *9*, 1386-1418; b) M. Hwang, L. Moretti, B. Lu, *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 3081-3092.

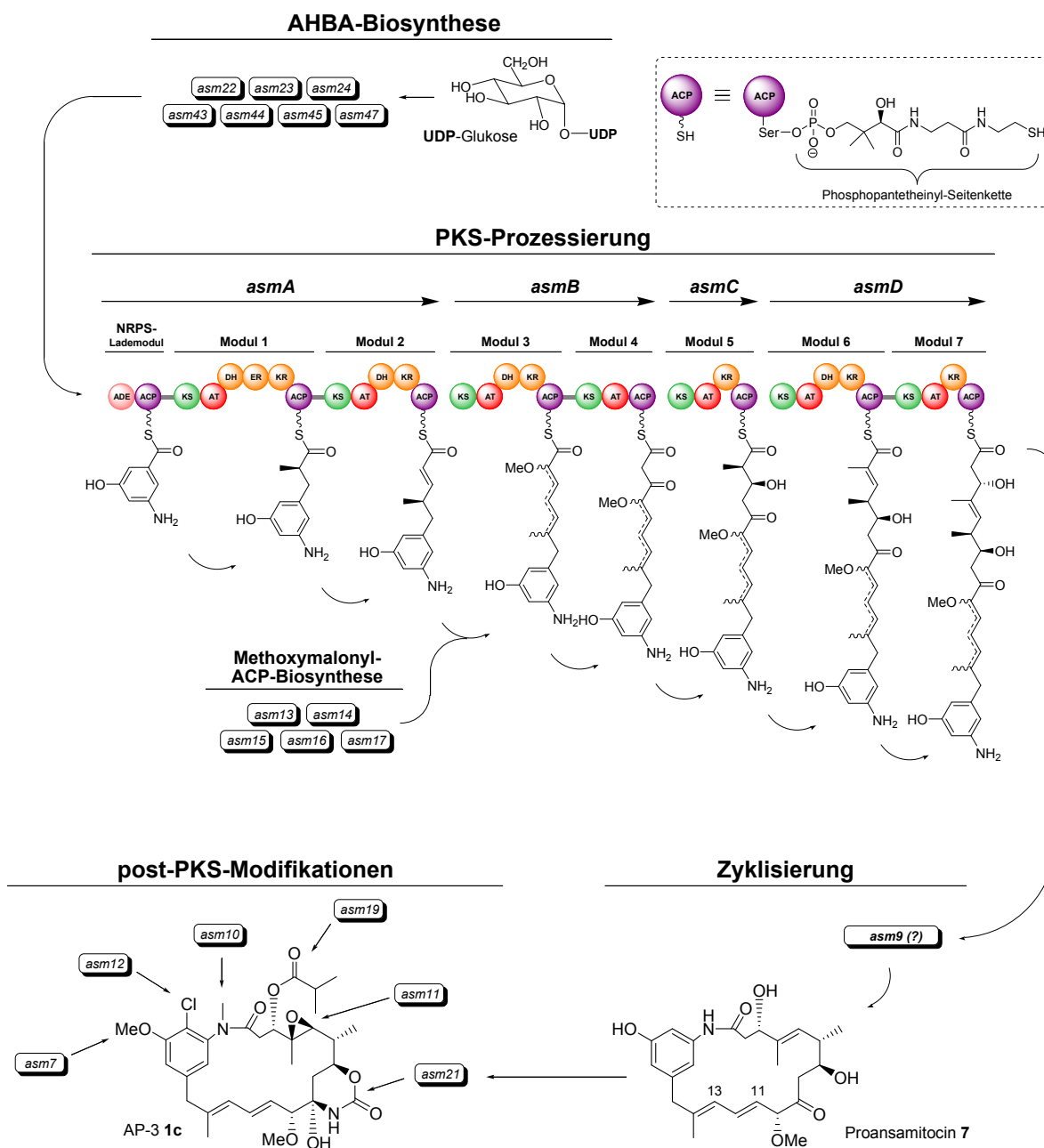
²⁵ T.-W. Yu, L. Bai, D. Clade, D. Hoffmann, S. Toelzer, K. Q. Trinh, J. Xu, S. J. Moss, E. Leistner, H. G. Floss, *Proc. Nat Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 7968 – 7973.

²⁶ S. Tanida, M. Izawa, T. Hasegawa, *J. Antibiot.* **1981**, *34*, 489-495.

²⁷ C.-G. Kim, A. Kirschning, P. Bergon, P. Zhou, E. Su, B. Sauerbrei, S. Ning, Y. Ahn, M. Breuer, E. Leistner, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7486-7491.

²⁸ Eine Übersicht bieten: a) S. Smith, S. C. Tsai, *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 1041-1072; b) J. L. Meier, M. D. Burkart, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 2012-2045; c) C. Khosla, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 6416-6420.

domäne (ADE) die Benzoessäurefunktion von AHBA **6** in Form eines gemischten Säureanhydrids mit Adenosinmonophosphat aktiviert und anschließend auf die terminale Thiol-Funktionalität der Phosphopantetheinyl-Seitenkette des benachbarten Acylträgerproteins (ACP) transferiert.²⁹



Schema 3: Zusammenfassung der Ansamitocin-Biosynthese in *A. pretiosum* subsp. *auranticum* ATCC 31565 unter Angabe der beteiligten *asm*-Biosynthesegene.

²⁹ S. J. Admiraal, C. T. Walsh, C. Khosla, *Biochemistry* **2001**, *40*, 6116-6123.

Die Acyltransferasen (AT) der Elongationsmodule wählen ihrerseits als CoA-Thioester aktivierte und je nach Selektivität der AT gegebenenfalls substituierte Malonsäurederivate aus und laden diese auf das jeweilige Modul-interne ACP. Im Rahmen der Ansamitocin-Biosynthese sind dies vor allem die für viele Polyketidbiosynthesen genutzten Substrate Malonyl-SCoA (Module 2, 4 und 7) und Methylmalonyl-SCoA (Module 1, 5 und 6). Der ungewöhnliche, Methoxy-substituierte Malonsäure-Baustein (Modul 3) wird hingegen nicht als CoA-Thioester, sondern über ein eigenständiges ACP der PKS-Prozessierung zugeführt.³⁰ Unter Decarboxylierung des als Thioester gebundenen Malonsäurederivats katalysieren Ketosynthase-(KS)-Domänen die Übertragung des jeweiligen Vorläuferintermediats auf das ACP des Moduls im Rahmen einer CLAISEN-Kondensation. Das Produkt bleibt zunächst an das ACP gebunden und kann reduktiv prozessiert werden. Die neu entstandene β -Carbonylgruppe kann durch eine Ketoreduktase (KR) stereoselektiv reduziert werden (vgl. Modul 5 und 7), woraufhin durch eine Dehydratase (DH) die Umwandlung zum α,β -ungesättigten Produkt erfolgen kann (vgl. Modul 2 und 3). In Anwesenheit einer Enoylreduktase (ER) kann daraufhin die stereoselektive Reduktion zum gesättigten System erfolgen (vgl. Modul 1). Im Gegensatz zu typischen Polyketidsynthasen des Typs I besitzt die *Asm*PKS keine terminale Thioesterase-Domäne zur Abspaltung des Endprodukts von der PKS. Die Makrolaktamisierung zum ersten freien Produkt Proansamitocin **7** wird hingegen der katalytischen Aktivität eines unabhängigen Enzyms zugeschrieben. Die vermutete Amidsynthase *Asm9* weist einerseits Sequenzhomologie zu Arylamin-*N*-acetyltransferasen auf, andererseits wurde eine vergleichbare Organisation mit homologen Genprodukten auch in anderen Ansamycin-Biosynthesegenclustern vorgefunden, so dass eine generelle Bezeichnung als Ansamycin-Amidsynthasen vorgezogen werden sollte.³¹

Bereits das erste freie Produkt der *Asm*PKS zeichnet sich durch ein für Polyketide untypisches $\Delta^{11,13}$ -Diensystem aus, das als Ergebnis einer Doppelbindungswanderung anzusehen ist. Die im Rahmen der PKS-Prozessierung noch vorhandene Stereochemie (vgl. Modul 1 und 2) des im Endprodukt planarisierten Zentrums an C-14 konnte durch Studien von KUBOTA *et al.* aufgeklärt werden.³² Während der Zeitpunkt dieser Dien-Migration zwar der PKS-Prozessierung zugeschrieben wird,³³ konnte bisher weder eine Zuweisung zu einem bestimmten Modul, noch ein Vorschlag zum zugrunde liegenden Mechanismus erfolgen.

³⁰ B. J. Carrol, S. J. Moss, L. Bai, Y. Kato, S. Zoelzer, T.-W. Yu, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4176-4177.

³¹ a) T. Knobloch, Masterarbeit, *Versuche zur Expression des asm9-Amidsynthasegens aus Actinosynnema pretiosum*, Universität Hannover, Hannover **2006**; b) F. Pompeo, A. Mushtaq, E. Sim, *Protein Expression Purif.* **2002**, *24*, 138-151.

³² T. Kubota, M. Brünjes, T. Frenzel, J. Xu, A. Kirschning, H. G. Floss, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1221-1225.

³³ P. Spiteller, L. Bai, G. Shang, B. J. Carrol, T.-W. Yu, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14236-14237.

Das basale Makrolaktam Proansamitocin **7** wird schließlich durch sechs post-PKS-Modifizierungsschritte in das biologisch aktive Endprodukt überführt. Diese beinhalten Chlorierung (*Asm12*), *O*-Methylierung (*Asm7*), Carbamoylierung (*Asm21*), Acylierung (*Asm19*), sowie Epoxidierung (*Asm11*) und *N*-Methylierung (*Asm10*).

3 Zielsetzung

Die vorliegende Dissertation betrachtet die Substratflexibilität der Ansamitocin-Biosynthese des Actinomyceten *Actinosynnema pretiosum* ssp. *auranticum* ATCC 31565 auf verschiedenen Komplexitätsebenen.

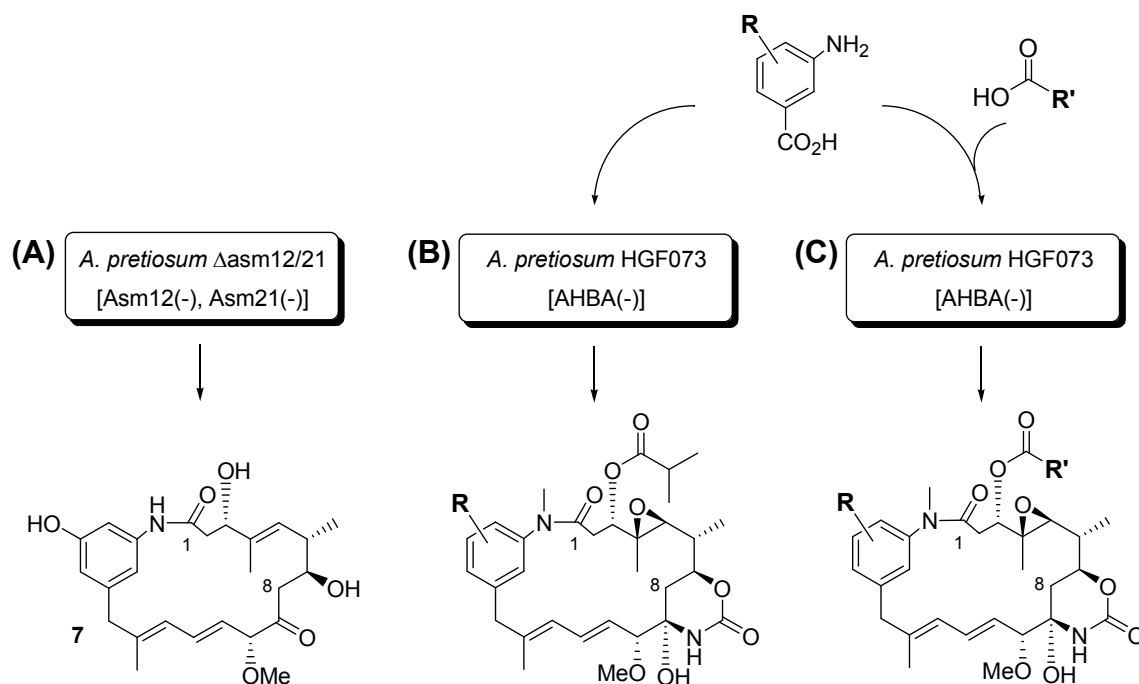
Im ersten Teil der Arbeit wird das komplexe enzymatische System der Ansamitocin-Biosynthese zur Darstellung von natürlichen und mutasynthetisch veränderten Derivaten des Ansamitocin-Strukturtyps genutzt. Dies soll durch Fermentation von *A. pretiosum*-Mutanten erfolgen, die in Schlüsselschritten der Ansamitocin-Biosynthese blockiert sind und von der Arbeitsgruppe FLOSS bereitgestellt wurden. Die isolierten Substanzen werden sowohl zur Bestimmung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen, als auch gegebenenfalls zur weiteren Umsetzung durch chemische oder chemoenzymatische Verfahren dienen. Neben der Darstellung von gewünschten Zielprodukten gilt hierbei auch der Isolierung von bisher unbekannten Zwischen- und Nebenprodukten ein besonderes Interesse. Aus dem auftretenden Substanzspektrum ergeben sich Einsichten in die Flexibilität der biosynthetischen Enzymmaschinerie, die weiterhin die Möglichkeiten und Limitierungen von *A. pretiosum*-Mutanten als Synthesewerkzeuge zur Erzeugung komplexer Strukturen des Ansamitocin-Typs darlegen.

Der zweite Teil der Arbeit hat hingegen nicht die Erzeugung und Isolierung von Substanzen zum Ziel, sondern widmet sich der mechanistischen Betrachtung eines Schlüsselschritts der Ansamitocin-Biosynthese.

3.1 Wege zu Ansamitocin-Derivaten

Zunächst soll durch Kultivierung von *A. pretiosum* Δ asm12/21 die bekannte mutasynthetische Darstellung von Proansamitocin **7** als fermentativer Zugang zu diesem Ansamitocin-Vorläufer etabliert werden, der auch als Ausgangssubstanz für zukünftige semisynthetische Studien interessant wäre (Schema 4, A). Die Mutationsinaktivierung zweier post-PKS-Biosyntheseschritte verhindert hierbei nach SPITELLER *et al.* die weitere Prozessierung zu Ansamitocinen, wobei nur Proansamitocin **7** als einziges Produkt der Ansamitocin-Biosynthese durch *A. pretiosum* Δ asm12/21 bekannt war.³³ Sollten ungewöhnliche

Nebenprodukte auftreten, müsste überprüft werden, inwiefern diese durch die Enzyme der post-PKS-Biosynthese prozessiert werden können. Hierfür würde die bereits in vorherigen Arbeiten genutzte Mutante *A. pretiosum* HGF073 Verwendung finden (*vide infra*),^{36,37} die sich durch eine blockierte Biosynthese der essenziellen PKS-Startereinheit AHBA 6 auszeichnet, aber die Fähigkeit zur vollständigen post-PKS-Prozessierung besitzt.



Schema 4: Mutasynthetische Wege zu Ansamitocin-Derivaten. (A) Mutasynthese von Proansamitocin 7; Mutasynthesen mit AHBA-Analoga (B), sowie unter zusätzlicher Vorläufer-dirigierter Biosynthese mit Esterseitenkettenvorläufern (C).

Die Mutante *A. pretiosum* HGF073 stellt durch ihren AHBA(-)-Phänotyp ein ideales Werkzeug für die mutasynthetische Darstellung von unnatürlichen Ansamitocin-Derivaten ausgehend von zugefütterten Vorläufern dar.³⁴ In Fortführung und auf Basis der in der Arbeitsgruppe KIRSCHNING erfolgten Vorarbeiten^{35,36,37} sollen AHBA-analoge Bausteine synthetisiert und als mögliche Vorläufer zu Kulturen von *A. pretiosum* HGF073 supplementiert werden (Schema 4, B). Sollten diese Mutasynthone von der

³⁴ *A. pretiosum* HGF073 ist ein Replikant des Stamms HGF056, beschrieben in: T.-W. Yu, L. Bai, D. Clade, D. Hoffmann, S. Toelzer, K. Q. Trinh, J. Xu, S. J. Moss, E. Leistner, H. G. Floss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 7968-7973.

³⁵ a) F. Taft, M. Brünjes, H. G. Floss, N. Czempinski, S. Grond, F. Sasse, A. Kirschning, *ChemBioChem* **2008**, 9, 1057-1060; b) A. Meyer, M. Brünjes, F. Taft, T. Frenzel, F. Sasse, A. Kirschning, *Org. Lett.* **2007**, 9, 1489-1492.

³⁶ F. Taft, Dissertation, *Studien zur Ansamitocin-Biosynthese in Actinosynnema pretiosum / Synthese Tumorerichteter Ansamitocin-Derivate*, Universität Hannover, Hannover **2009**.

³⁷ M. Brünjes, Dissertation, *Studien zur chemoenzymatischen Synthese und Biosynthese von Maytansinoid-Analoga*, Universität Hannover, Hannover **2006**.

Biosynthesemaschinerie akzeptiert werden, würden sich unnatürliche Ansamitocin-Derivate mit Variationen des arylischen Strukturelements ergeben.

Ein weiteres durch Vorläufer-Zugabe adressierbares Strukturelement stellt die Esterseitenkette der Ansamitocine dar. Während sich bisherige Arbeiten allerdings auf natürliche Vorläufer beschränkten,³⁸ würde die vorliegende Arbeit eine Einführung unnatürlicher Seitenketten zum Ziel haben, die zudem mit der mutasynthetischen Adressierung des arylischen Strukturelements unter Nutzung von *A. pretiosum* HGF073 kombinierbar wäre (Schema 4, C). Die Acylseitenkettenvorläufer sollen so gewählt werden, dass eine anschließende chemische Derivatisierung erfolgen kann, die beispielsweise zur Erzeugung der einleitend diskutierten Tumor-gerichteten Ansamitocin-Konjugate genutzt werden könnte. Nach erfolgreicher Darstellung entsprechender Ansamitocin-Derivate würde die Durchführbarkeit der geplanten semisynthetischen Transformationen im Rahmen dieser Arbeit allerdings vorerst an Beispielen gezeigt werden, die eine Grundlage für zukünftige Arbeiten zur Synthese entsprechender Konjugate bilden würden.

Prinzipiell kann die Biosynthese von Ansamitocin-Derivaten im Rahmen eines Vorläufer-dirigierten Ansatzes nur beeinflusst, nicht jedoch kontrolliert werden. Insofern sollen erste Schritte auf dem Weg zur Etablierung eines definierten *in vitro*-Systems zur enzymatischen Einführung der neben dem 7-*O*-Carbamat für eine biologische Aktivität essenziellen 3-*O*-Acylseitenkette aufgezeigt werden. Hierfür sollen bekannte Substrate und potentielle Cosubstrate der Enzyme auf fermentativem, beziehungsweise synthetischem Weg bereitgestellt werden, die in zukünftige Studien mit den heterolog exprimierten Enzymen einfließen werden.

³⁸ K. Hatano, E. Higashide, S. Akiyama, M. Yoneda, *Agric. Biol. Chem.* **1984**, 48, 1721-1729

3.2 Studien zum Mechanismus der Dien-Migration

Strukturen des Ansamitocin-Typs weisen das bereits einleitend diskutierte PKS-untypische $\Delta^{11,13}$ -Diensystem auf (Abbildung 4).

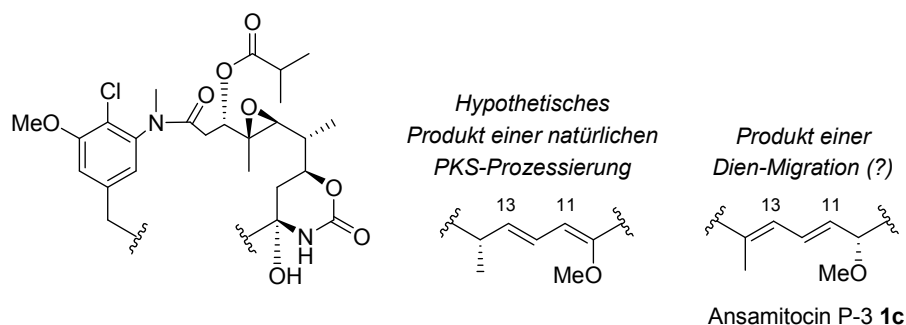


Abbildung 4: Das bei Strukturen des Ansamitocin-Typs auftretende ungewöhnliche $\Delta^{11,13}$ -Diensystem im Vergleich zum auf Basis einer natürlichen PKS-Prozessierung zu erwartenden $\Delta^{10,12}$ -Diensystem.

Während in von FLORIAN TAFT³⁶ durchgeführten Vorläufer-Supplementierungsstudien eine experimentelle Untersuchung dieses Phänomens erfolgen würde, soll auf Basis der erzielten Ergebnisse ein Vorschlag zum Biosynthesemechanismus der vermuteten Doppelbindungs-wanderung unter Analyse der bekannten *asm*PKS-Sequenz erarbeitet werden.²⁵

4 Beschreibung und Diskussion der Ergebnisse

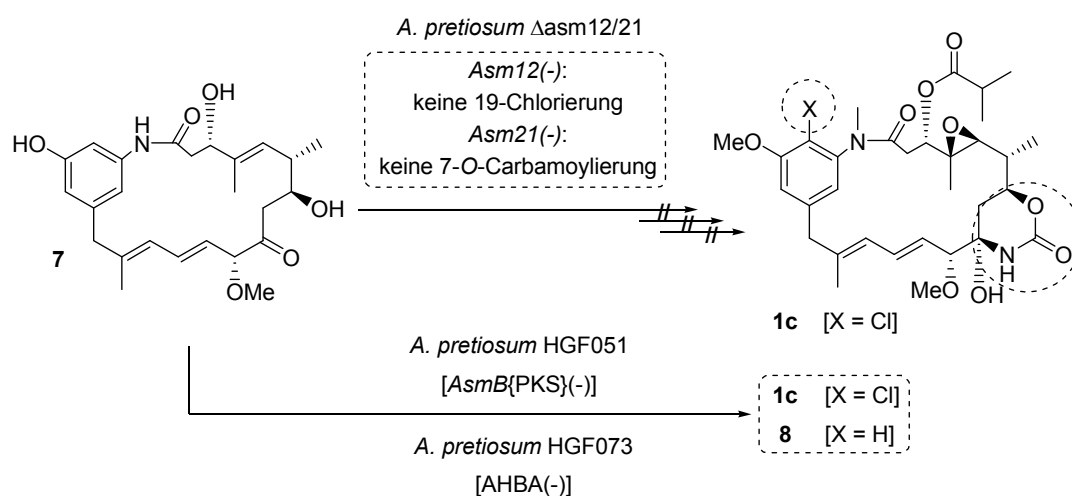
4.1 Wege zu Ansamitocin-Derivaten

4.1.1 Mutasynthese von Proansamitocin-Derivaten

Die Biosynthese der Ansamitocine in *Actinosynnema pretiosum* ssp. *auranticum* ATCC 31565 umfasst zahlreiche, bereits einleitend beschriebene Biosyntheseschritte, die das nach PKS-Prozessierung und Zyklisierung gebildete Makrolaktam **7** schrittweise in Endprodukte wie Ansamitocin P-3 (AP-3) **1c** überführen. Proansamitocin **7** stellt das erste, nicht Enzym-gebundene Zwischenprodukt nach der Polyketidbiosynthese dar und sollte prinzipiell durch Fermentation zugänglich sein.

4.1.1.1 Vorarbeiten

Eine fermentative Darstellung von Proansamitocin **7** wurde bereits durch die Arbeiten von SPITELLER *et al.* beschrieben, für die eine in den Chlorierungs- und Carbamoylierungsschritten blockierte Deletionsmutante erstellt wurde.³³ Diese Mutationen verhinderten in der Kombination eine weitere Prozessierung durch die verbliebenen post-PKS-Enzyme, so dass Proansamitocin **7** als einziges Produkt der Fermentation von *A. pretiosum* Δ asm12/21 auftrat (Schema 5).



Schema 5: Proansamitocin **7** als Produkt der doppelt in der post-PKS-Prozessierung blockierten Mutante *A. pretiosum* Δ asm12/21 und Biotransformation dieses Vorläufers zu Ansamitocinen **1c** und **8**.^{33, 35b}

Zudem konnte eine mutasynthetische Biotransformation dieses Vorläufers zu AP-3 **1c** nach Fermentation mit einer weiteren, in der PKS-Prozessierung blockierten Mutante erfolgen. Eine vergleichbare Umsetzung zu AP-3 **1c** konnte auch in Arbeiten von MEYER und TAFT erreicht werden (Schema 5).^{35b} Durch Fermentation synthetisch dargestellten Proansamitocins **7** mit einer in der Biosynthese der Startereinheit AHBA **6** blockierten Mutante konnten neben den übereinstimmenden NMR-Daten somit auch ein biologischer Nachweis für die Authentizität des Syntheseprodukts erzielt werden. Abgesehen vom vollständig prozessierten AP-3 **1c** führte diese Biotransformation auch zum 19-Dechloro-AP-3 **8**, was auf eine schnelle Methylierung des für eine Halogenierung benötigten freien Phenols durch die entsprechende *O*-Methyltransferase *Asm7* zurückgeführt wurde.

Durch die synthetischen Arbeiten von MEYER konnte allerdings nur weniger als 1 mg des biologisch inaktiven Proansamitocins **7** im Rahmen einer aufwendigen Synthese bereitgestellt werden, während über Fermentation ein einfacherer Zugang zu größeren Produktmengen zu erwarten war.

4.1.1.2 Fermentation

Die einführend beschriebene Mutante *A. pretiosum* Δ asm12/21 wurde durch PETER SPITELLER bereitgestellt. Während für diese Mutante nur Proansamitocin **7** als einziges Produkt bekannt war, so lagen keine Daten zur zu erwartenden Fermentationsausbeute vor. Durch das limitierte Produktspektrum bot sich mit dieser Mutante ein Modellsystem für Fermentationsstudien zu *A. pretiosum* an, wobei die Fermentationsüberstände mittels *reversed phase*-HPLC-Analytik unter photometrischer Detektion (UV) untersucht werden konnten (Abbildung 5). An dieser Stelle sollen zunächst die Erkenntnisse zur Fermentation von *A. pretiosum* Δ asm12/21 Erwähnung finden, die sich in grundlegenden Zügen auch auf die weiteren in dieser Arbeit behandelten Stämme übertragen ließen.

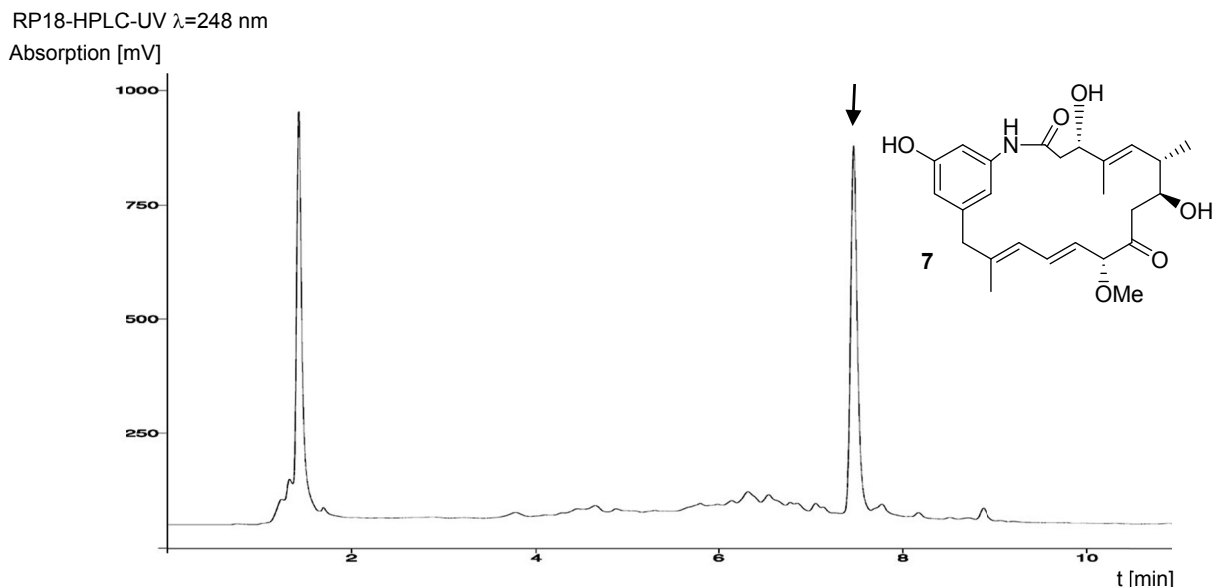


Abbildung 5: Typisches *reversed phase*-HPLC-Chromatogramm der Kulturbrühe nach Fermentation von *A. pretiosum* Δ asm12/21. Das Signal von Proansamitocin 7 ist durch einen Pfeil hervorgehoben.³⁹

Eine erfolgreiche Sekundärmetabolitproduktion hängt insbesondere von der Selektion geeigneter Kolonien des bakteriellen Produzenten ab. Für Actinomyceten bietet sich als auffälliger Parameter die nach Kultivierung auf geeignetem Agarmedium gezeigte Koloniemorphologie an. Hierbei können makroskopisch unter anderem die Pigmentierung des Mycels, sowie Wachstum und Sporulierungsstärke der Kolonien zur Evaluierung herangezogen werden. Insbesondere eine starker Hang zur Ausbildung von Sporen wird bei Actinomyceten häufig mit einer hohen Bereitschaft zur Sekundärmetabolitproduktion in Verbindung gebracht.⁴⁰

Nach zahlreichen Fermentationsläufen konnten für *A. pretiosum* Δ asm12/21 in der Tat solche Kolonien als Höchstproduzenten identifiziert werden, die nach Auskeimung aus Sporen auf frischen Agarplatten innerhalb von 3 bis 4 Tagen bei 30 °C ein gelbes, weiches Mycel und einen ausgeprägten Besatz mit weiß erscheinenden Sporen aufwiesen (Abbildung 6). In allen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Fermentationen mit *A. pretiosum*-Mutanten erwies sich die Sporulierungsstärke als Hauptkriterium für eine vielversprechende Fermentation. Die Fermentation von schwach oder nicht sporulierten Kolonien mit kompakter, harter Oberfläche lieferte hingegen grundsätzlich nur massenspektrometrisch detektierbare Spuren an gewünschten Produkten.

³⁹ Bedingungen: Säule C18-A, Elutionsprogramm B; s. Experimenteller Teil.

⁴⁰ a) K. F. Chater, *Annu. Rev. Microbiol.* **1993**, 47, 685-713; b) M. Elliot, F. Damji, R. Passatino, K. Chater, B. Leskiw, *J. Bacteriol.* **1998**, 180, 1549-1555.

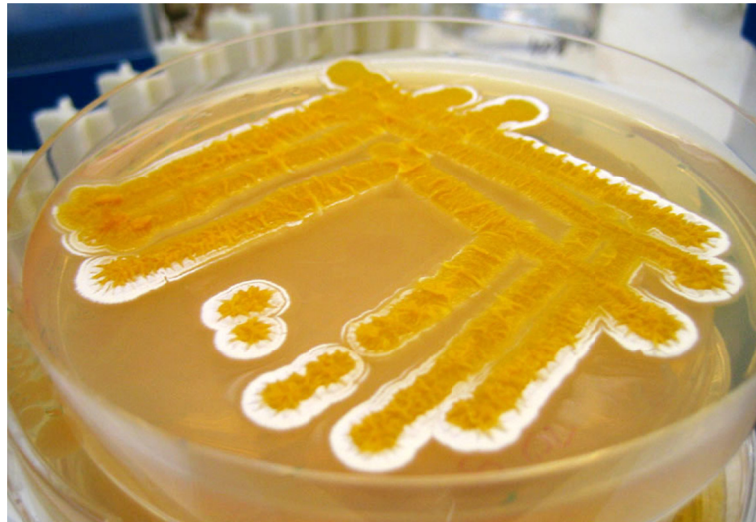


Abbildung 6: *A. pretiosum*-Stamm nach Inkubation auf YMG-Agar.

Obwohl das von SPITELLER bereitgestellte Sporenpräparat sich als sehr heterogen darstellte, zeigten sich auf Basis des Sporulierungsgrads selektierte Kolonien in weiteren Subkultivierungen als morphologisch stabil. Aus Gründen der Stammerhaltung wurde jedoch grundsätzlich von einem Sporenpräparat der ersten Filialgeneration ausgegangen und in Hinblick auf die im Rahmen von Sporulationsprozessen auftretenden genetischen Diversifizierungen mehrere Kolonien zur Inokulation einer Vorkultur verwendet.

Für Produktionskulturen wurde das bereits optimierte K-Medium mit produktionssteigerndem Zusatz von L-Valin verwendet (vgl. Kapitel 4.1.2).⁴¹ Allerdings wurde für die Fermentationsaufarbeitung eine Verfahrensoptimierung in Betracht gezogen.

In Vorarbeiten im Arbeitskreis KIRSCHNING musste die Gesamtfermentationsbrühe auf das doppelte Volumen mit Wasser verdünnt werden, um bei Extraktion mit Ethylacetat im Scheidetrichter eine Phasentrennung erreichen zu können. Grund hierfür waren neben den unlöslichen Bestandteilen des komplexen Kultivierungsmediums auch die Wachstumsmorphologie des Actinomyceten. Erste Versuche zur Verwendung von Adsorberharzen (XAD18) für die Rohproduktgewinnung zeigten sich dann im Rahmen der vorliegenden Arbeit für *A. pretiosum*-Schüttelkulturen als wenig praktikabel, da eine Abtrennung der Harzkügelchen von den restlichen Feststoffen sich als schwierig darstellte. In Analogie zu Arbeiten von ASADA *et al.* an Pflanzenzellkulturen wurde das Harz in sterilen, biologisch nicht abbaubaren Nylonnetzen während der Fermentation in der Kulturbrühe platziert.⁴² Die erwartete kontinuierliche Extraktion des Fermentationsmediums konnte

⁴¹ S. Bandi, Y. J. Kim, S. O. SA, Y.-K. Chang, *J. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, 15, 930-937.

⁴² M. Asada, M. L. Shuler, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1989**, 30, 475-481.

allerdings nicht erfolgen, da sich das wachsende Mycel bevorzugt auf der polaren Nylonoberfläche ausbreitete und so eine Durchströmung verhinderte (Abbildung 7).

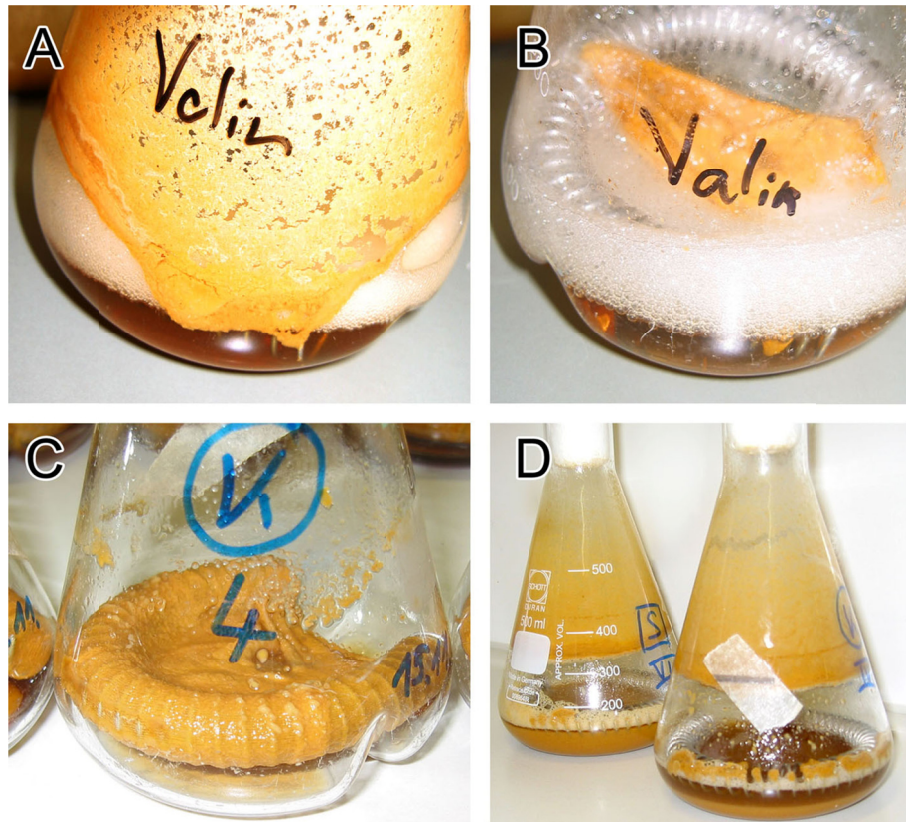


Abbildung 7: Wachstum von *A. pretiosum*-Stämmen in Produktions-Schüttelkulturen (Medium K). (A) Adhäsives Wachstum an der Kolbenwandung; (B) & (C) Adhäsives Wachstum des gelben Mycels auf weißen Nylonstrümpfen; (D) Disperses Wachstum in kleinen Mycelkugeln.

Dies führte allerdings zur Klärung des Fermentationsüberstands, so dass in Folgeversuchen mit Nylonnetzen versetzte Schüttelkulturen verwendet wurden. Die Extraktion des klaren Fermentationsüberstands gelang nun mit Ethylacetat ohne weitere Verdünnung. Allerdings stellte sich bei Untersuchungen zur relativen Produktverteilung heraus, dass rund $28 \pm 6 \%$ des produzierten Proansamitocins **7** im Mycel enthalten waren⁴³ und durch methanolische Extraktion gewonnen werden mussten.

Ohne Nylonnetze erfolgte ein adhäsives Wachstum gelegentlich in der Schaumzone an der Kolbenwandung, die durch zur Belüftung eingesetzte Stahlfedern erzeugt wurde (Abbildung 7). Da sich Schaum auf dem bewachsenen Nylonnetz ablagerte, wurde zur besseren Belüftung auf ein in der Patentliteratur für *A. pretiosum* beschriebenes Antischaummittel

⁴³ n = 20 Kulturen; Angegebenen sind Mittelwert und Standardabweichung; Bestimmt durch analytische reversed-phase HPLC, s. Experimenteller Teil.

zurückgegriffen.⁴⁴ In weiteren Studien erwies sich dann der Zusatz des Antischaummittels als ausreichend, um reproduzierbar das Wachstum des Organismus in makroskopisch kleinen, suspendierten Mycelkugeln zu bewirken und eine einfache Gesamtextraktion von Fermentationsbrühe und Mycel mit Ethylacetat im Scheidetrichter zu ermöglichen.

4.1.1.3 Erhaltene Proansamitocin-Derivate

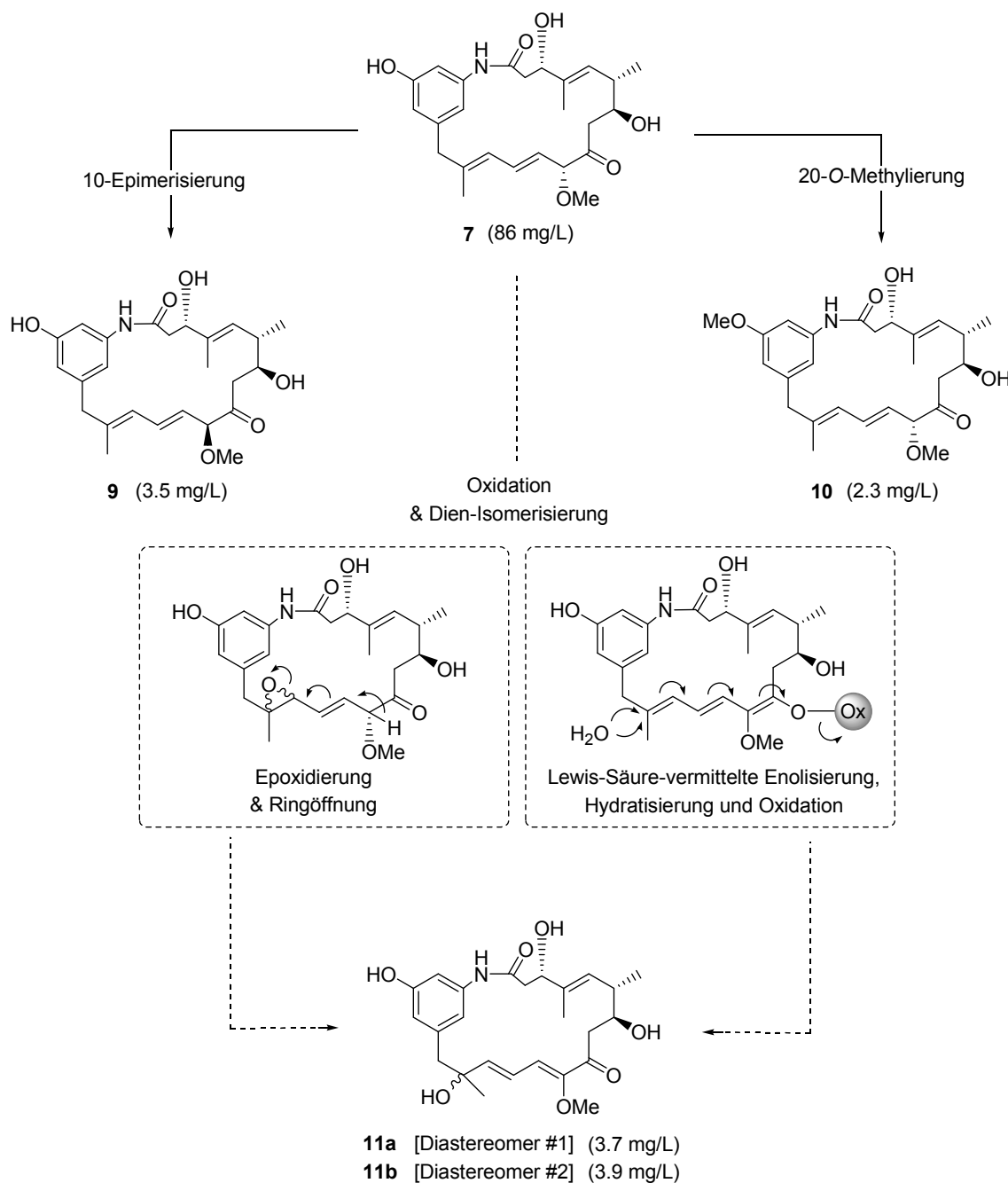
Durch die beschriebenen Versuche zur Fermentation gelang die Darstellung von insgesamt 265 mg Proansamitocin **7** aus 3.09 L Fermentationsansätzen in einer isolierten Fermentationsausbeute von 86 mg/L. In weiteren, teils von ANNE PIEPER durchgeführten Fermentationsläufen variierte die Ausbeute zwischen 36 und 106 mg/L. Innerhalb eines Fermentationslaufs lag die durch HPLC-Analyse ermittelte Kolben-zu-Kolben-Variation für hoch produzierende Kulturen typischerweise unter 10 %, während sie bei schlechteren Fermentationen bis zu 25 % betrug.⁴⁵

Allerdings erwies sich das mit der Literaturdaten³³ übereinstimmende Proansamitocin **7** mit einem Anteil von 86.7 % zwar als Hauptkomponente der erwähnten 3.09 L-Fermentation, stellte jedoch nicht das einzige erhaltene Produkt dar (Schema 6). Im Verlauf der mittels Größenausschlußchromatographie und *reversed phase*-HPLC durchgeführten Reinigung wurde eine zweite Substanz isoliert, der massenspektrometrisch ebenfalls die Summenformel von Proansamitocin **7** zugewiesen werden konnte. Im Rahmen von NMR-spektroskopischen Untersuchungen zeigten sich bei der unbekannten Verbindung im Vergleich zu Proansamitocin **7** insbesondere Veränderungen in der südöstlichen Hemisphäre des Grundgerüsts (Abbildung 8). Hierbei konnten vor allem Abweichungen des Protons an C-10 hinsichtlich chemischer Verschiebung und ermittelter Kopplungskonstanten festgestellt werden. Besonders anschaulich zeigten nOe-Experimente⁴⁶ eine Umkehrung der Kontaktintensität zu den verschiedenen, diastereotopen Protonen an C-8.

⁴⁴ US Patent 6790954.

⁴⁵ n = 10-12 Kulturen.; Angaben entsprechen den ermittelten Variationskoeffizienten; Bestimmt durch analytische *reversed-phase* HPLC, s. Experimenteller Teil.

⁴⁶ nuclear OVERHAUSER effect, Methode zur halbquantitativen Bestimmung der räumlichen Abstände von Protonen: A. W. Overhauser, *Phys. Rev.* **1953**, *91*, 476; A. W. Overhauser, *Phys. Rev.* **1953**, *92*, 411-415.



Schema 6: Nach Fermentation von *A. pretiosum* Δasm12/21 isolierte Proansamitocin-Derivate im Kontext eines Vorschlags zu ihrer Biogenese. Gestrichelte Pfeile deuten alternative Biosynthesewege an.

Zusammen genommen ergab sich aus diesen Daten die Struktur des dargestellten C-10-Epimers **9** von Proansamitocin **7**, dessen Auftreten wahrscheinlich auf eine chemische Epimerisierung bedingt durch die benachbarte Carbonylgruppe zurückzuführen ist. Das Epimer **7** machte mit einer Fermentationsausbeute von 3.5 mg/L allerdings nur einen Anteil von 3.6 % der isolierten Verbindungen aus.

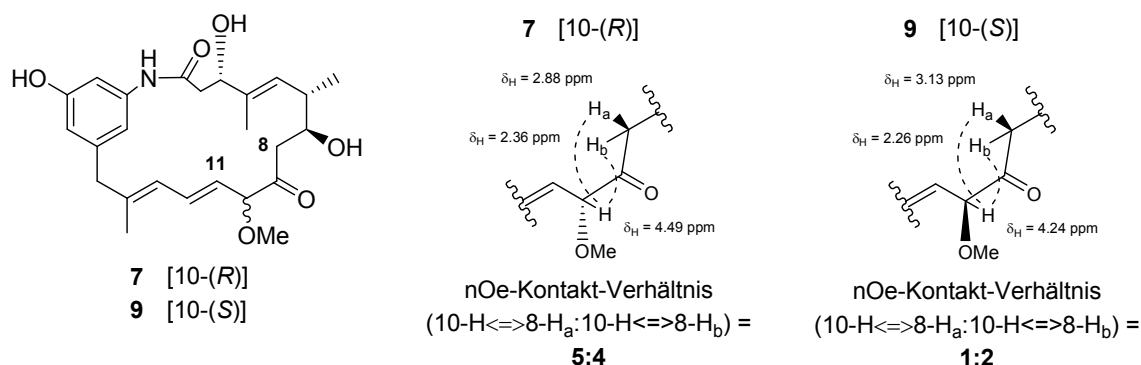


Abbildung 8: Ausgewählte Ergebnisse von nOe-Experimenten⁴⁶ an Proansamitocin **7** und dessen 10-Epimer **9**. Die angegebene Verhältnisse beziehen sich auf die Integrale der in zweidimensionalen nOe (NOESY)-Experimenten in Methanol-d₄ aufgetretenen Signale.

Als weitere Komponente konnte mit einem Anteil von 2.3 % das phenolisch *O*-methylierte Proansamitocin-Derivat **10** isoliert werden (Schema 6). Dies deutet darauf hin, dass die eingeführten Blockmutationen der Mutante *A. pretiosum* Δ asm12/21 zwar weitestgehend eine Prozessierung durch weitere post-PKS-Enzyme verhindern, jedoch eine verminderte Restaktivität der 20-*O*-Methyltransferase *Asm7* besteht.

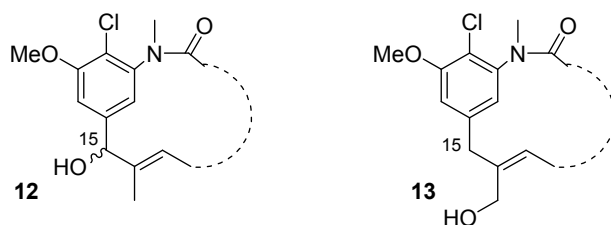
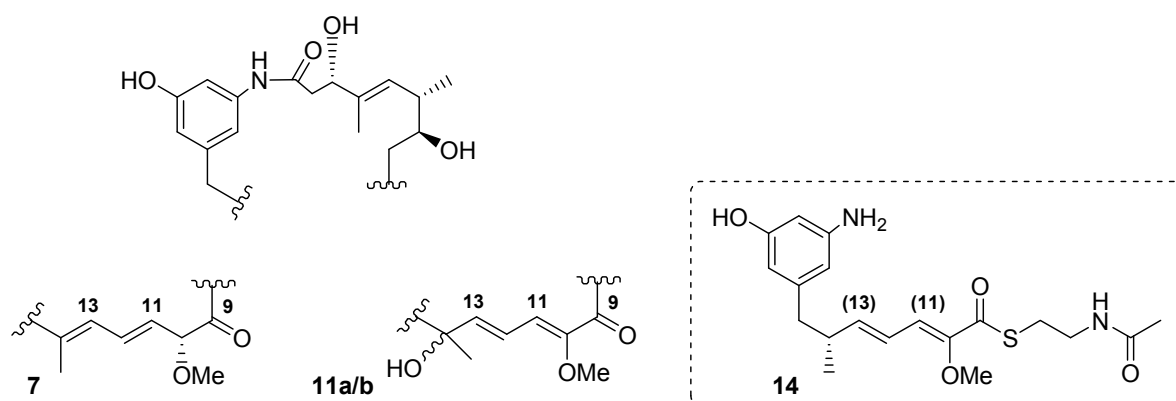


Abbildung 9: In der Literatur beschriebene, ungewöhnlich hydroxylierte Ansamitocin-Derivate.⁴⁷

Die Isolierung zweier Komponenten, denen massenspektrometrisch ein zusätzliches Sauerstoffatom im Vergleich zur Proansamitocin-Summenformel zugewiesen wurde, ging mit der Erwartung einher, dass es sich hierbei um 4,5-epoxidierte Verbindungen oder Derivate der bekannten 15-Hydroxy- (**12**) und 14-Hydroxymethyl-Ansamitocine **13** handeln würde (Abbildung 9).⁴⁷ Die eingehenden Strukturhypothesen erwiesen sich allerdings als unvereinbar mit den erhaltenen NMR-Daten der isolierten Verbindungen. So zeigten die NMR-Spektren der unbekannten Komponenten zwar große Übereinstimmungen untereinander, erinnerten jedoch nur rudimentär an die bereits beschriebenen Proansamitocin-Derivate. Insbesondere fehlte ein Signal für das Proton an Position 10, wobei zudem deutlich abweichende Verschiebungen für das Diensystem der südlichen Hemisphäre ermittelt werden

⁴⁷ M. Izawa, S. Tanida, M. Asai, *J. Antibiot.* **1981**, 34, 496-506.

konnten (Abbildung 10). Während der quartäre Kohlenstoff an Position 14 im ^{13}C -Spektrum von Proansamitocin **7** als Signal bei ~ 142 ppm erscheint, konnte dem entsprechenden Kohlenstoff der unbekannten Verbindungen **11a/b** ein Signal bei ~ 74 ppm zugewiesen werden. Durch eine in Studien von TAFT erzeugte, vergleichbare Verbindung (**14**) bestätigt,⁴⁸ waren die vorliegenden Daten eindeutig als ein in Konjugation mit der Carbonylgruppe an C-9 liegendes Doppelbindungssystem zu interpretieren, wobei zudem ein tertiärer Alkohol der Position 14 zugeordnet werden konnte.



Substanz	Kohlenstoff-Position und chemische Verschiebung δ_c [ppm]						
	9	10	11	12	13	14	14-Me
7	207.5	89.3	125.5	134.8	126.8	142.3	16.8
11a	198.6	152.7	130.7	121.4	149.7	74.2	27.3
11b	198.4	152.3	130.4	121.2	149.8	74.3	27.7
14	191.1	173.4	123.4	122.5	150.1	40.5	20.0

Abbildung 10: Ausgewählte analytische Daten des Doppelbindungssystems von Proansamitocin **7** und den erhaltenen Diastereomeren **11a/b** unter Gegenüberstellung einer vergleichbaren synthetischen Verbindung **14**.⁴⁸

Die 14-Hydroxy- $\Delta^{10,12}$ -proansamitocine **11a/b** konnten in einem Anteil von 3.6 % und 3.8 % an allen Produktkomponenten isoliert werden. Das Auftreten dieser chromatographisch trennbaren Diastereomere in einem Verhältnis von $\sim 1:1$ lässt auf einen gemeinsamen, nicht stereoselektiven Mechanismus für ihre Erzeugung schließen (Schema 6). Neben unselektiver Epoxidierung und anschließender Ringöffnung kann auch über eine oxidierende Lewis-Säure-vermittelte Umlagerungs-Hydratisierungs-Sequenz spekuliert werden.

Die Konfigurationen des jeweiligen Stereozentrums an Position 14 konnten nicht eindeutig zugewiesen werden. Während bereits die Protonenspektren nur geringe Unterschiede in der

⁴⁸ Verbindung **14**: F. Taft, M. Brünjes, T. Knobloch, H. G. Floss, A. Kirschning, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3812-3813.

Gesamtkonformation des Makrolaktams vermuten ließen, so zeigten sich die Diastereomere auch in nOe-Experimenten als nicht unterscheidbar. So wären bei den in Methanol-d₄ aufgenommenen Datensätzen zumindest unterschiedliche Umgebungen für die 14-Methylgruppe zu erwarten gewesen, deren jeweilige Kontakte sich allerdings in Anwesenheit und Intensität als identisch erwiesen. Die isolierte Position des C-14-Stereozentrums ließ zudem keine Relation zu den anderen Stereozentren des Makrolaktams zu, während eine Derivatisierung zur Bestimmung der absoluten Konfiguration nach MOSHER⁴⁹ aufgrund der geringen Reaktivität des tertiären Alkohols auch nicht als Alternative erschien. Eine Computer-assistierte Modellierung⁵⁰ der Makrolaktame resultierte in Konformationsvorschlägen für das jeweilige (*R*)- und (*S*)-Epimer, die allerdings deutliche Unterschiede in der räumlichen Umgebung der 14-Methylgruppe zeigten, was mit den vorliegenden experimentellen Daten nicht vereinbar war.

4.1.1.4 Mutasynthetische Biotransformation

Die zuvor diskutierten, ungewöhnlichen Derivate **9-11** waren aus der Fermentation einer Mutante hervorgegangen, in deren Ansamitocin-Biosynthese aufgrund fehlender Schlüsselschritte keine vollständige post-PKS-Prozessierung ablaufen konnte. Es stellte sich somit die Frage, ob eine Biotransformation zu weiter prozessierten Derivaten in analoger Verfahrensweise der beschriebenen Vorarbeiten erreicht werden könnte (Abschnitt 4.1.1.1). Hierfür wurde die einleitend erwähnte, in der AHBA-Biosynthese blockierte Mutante *A. pretiosum* HGF073 verwendet, die sich durch eine vollständige post-PKS-Biosynthese auszeichnet.

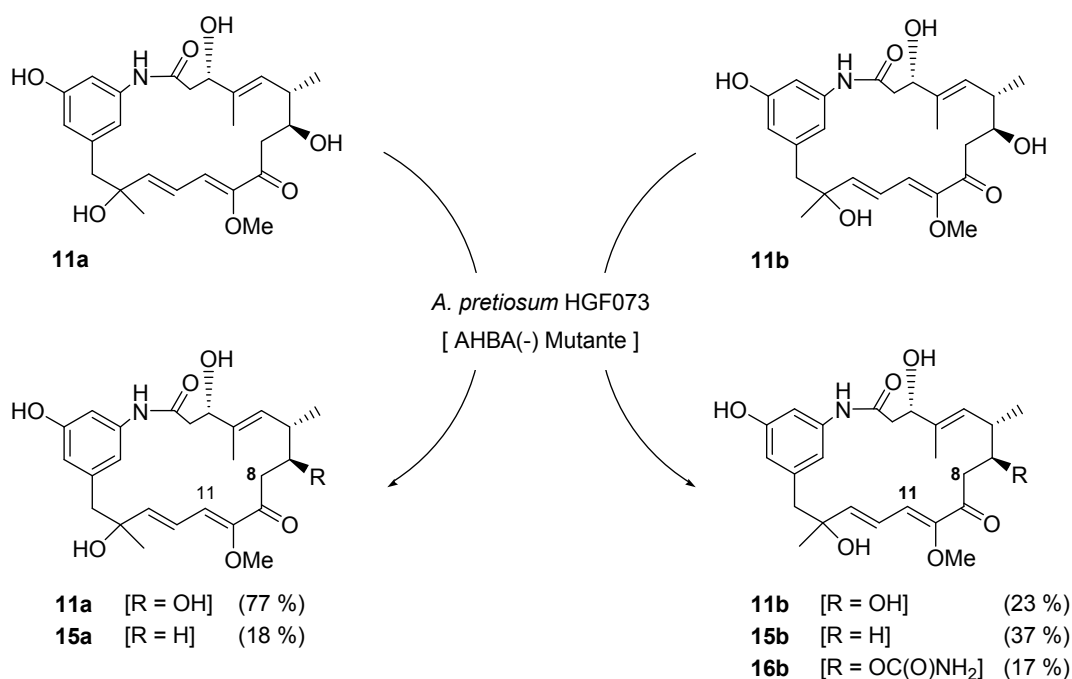
Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Transformationen beschränken sich auf die Fermentation der hydroxylierten Derivate **11a/b** mit *A. pretiosum* HGF073. Eine mutasynthetische Biotransformation des authentischen Proansamitocins **7** war bereits aus den beschriebenen Vorarbeiten bekannt, während das methylierte Proansamitocin **10** ein zwingendes Intermediat der publizierten und in Kapitel 4.1.2.1 beschriebenen Mutasynthese mit 3-Amino-5-methoxybenzoesäure darstellt.^{35b} Zudem konnte in vergleichbaren Arbeiten

⁴⁹ a) J. A. Dale, D. L. Dull, H. S. Mosher, *J. Org. Chem.* **1969**, *34*, 2543-2549; b) J. A. Dale, H. S. Mosher, *J. Am. Chem. Soc.*, **1973**, *95*, 512-519.

⁵⁰ Software SCHROEDINGER MAESTRO 9.0.109, MacroModel 9.7, Kraftfeld: OPLS2005, Energieminimierung PRCG, 10.000 Schritte.

von SIMONE EICHNER mit *Streptomyces hygroscopicus* K390-61-1⁵¹ eine Rückepimerisierung des 10-*epi*-Proansamitocins **9** zur natürlichen Konfiguration unter Fermentationsbedingungen beobachtet werden, weshalb auf eine entsprechende Umsetzung mit *A. pretiosum* HGF073 verzichtet wurde.

Nach Fermentation der Diastereomeren **11a/b** mit *A. pretiosum* HGF073 gelang neben der Reisolierung der verfütterten Edukte auch die Gewinnung von neuen Substanzen (Schema 7). Aus beiden Diastereomeren **11a/b** waren Produkte hervorgegangen, denen massenspektrometrisch das Fehlen eines Sauerstoff-Atoms nachgewiesen werden konnte.



Schema 7: Mutasynthetische Biotransformation der Diastereomeren **11a/b** mit *A. pretiosum* HGF073. Angaben beziehen sich auf isolierte Ausbeuten in Bezug auf Mutasynthese **11a/b**.

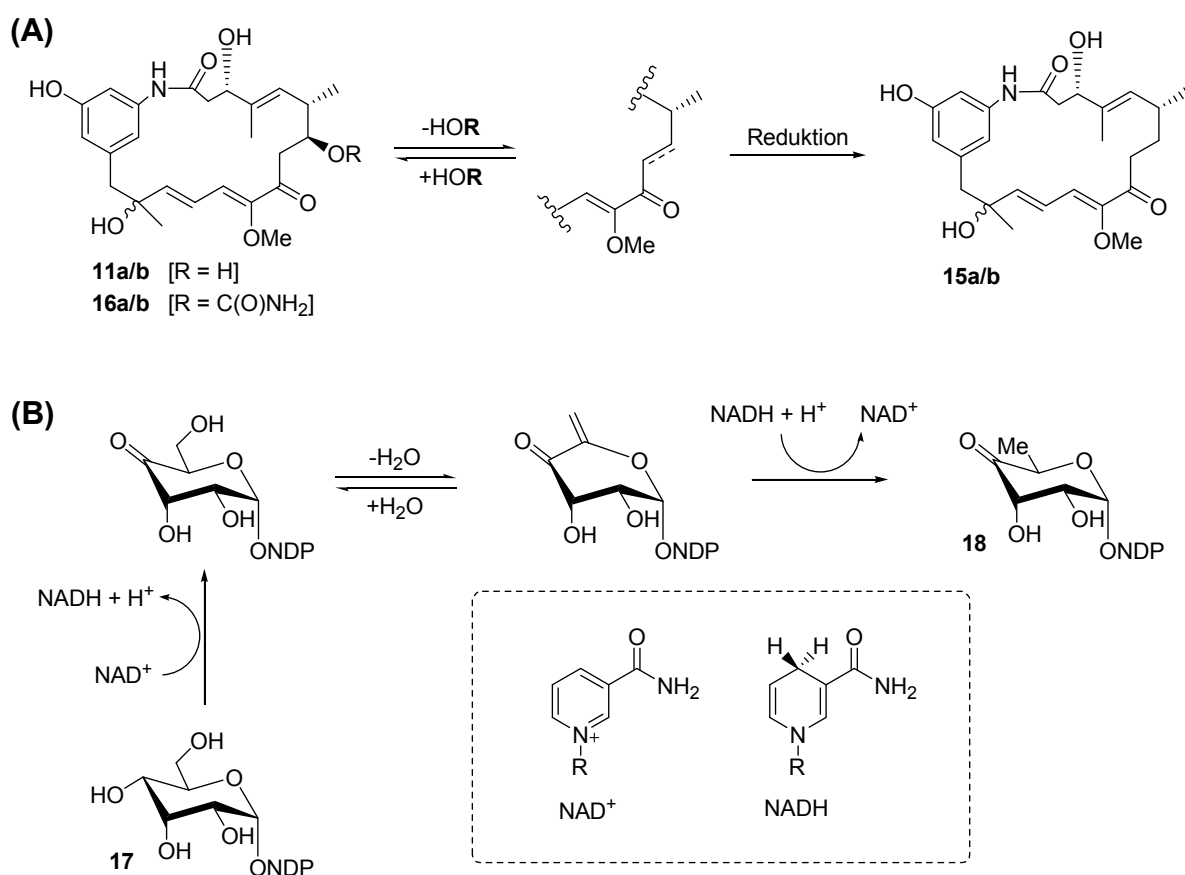
Dies stellte sich im Besonderen in phasen-sensitiven ¹H-¹³C-Korrelations-(HSQC)-Experimenten⁵² durch Erscheinen eines zusätzlichen Methylen-Kohlenstoffs und die Abwesenheit des sekundären Alkohols an C-7 dar. Obwohl die 7-desoxygenierten Diastereomere **15a/b** durch die größere Drehbarkeit der C-7/C-6-Achse bedingt deutlichere Unterschiede der Makrolaktam-Konformation in ¹H-Spektren zeigen, erwiesen sich nOe-Experimente in Verbindung mit Strukturmodellierung⁵⁰ erneut hinsichtlich der Konfiguration des Stereozentrums an C-14 als nicht aussagekräftig.

⁵¹ AHBA(-)-Mutante des Geldanamycin **5**-Produzenten *S. hygroscopicus* var. *geldanus* NRRL 3602.

⁵² HSQC = Heteronuclear Single Quantum Coherence. Korrelation von direkt gebundenen Kernen. Phasenunterscheidung grenzt CH- und CH₃- Gruppen von CH₂-Gruppen ab.

Ausgehend von Verbindung **11b** wurde das desoxygenierte Produkt **15b** in einer Ausbeute von 37 % erhalten, während das entsprechende Derivat **15a** nur mit Ausbeute von 17 % aus Edukt **11a** erzeugt werden konnte. Nur aus der Fermentation von Diastereomer **11b** konnte ein 7-*O*-carbamoyliertes Produkt **16b** isoliert werden. Dies lässt auf die Aktivität der 7-*O*-Carbamoyltransferase *Asm21* schließen. Im Gegensatz zu anderen 7-*O*-carbamoylierten (Pro-)Ansamitocin-Derivaten (vgl. Folgekapitel) liegt dieses Carbinolamid allerdings nicht in einer zyklischen Halbaminalform vor ($\delta_{\text{C-9}} \sim 197$ ppm statt ~ 82 ppm), was neben der durch Konjugation verringerten Carbonylaktivität an C-9 vor allem auf die deutlich veränderte Makrolaktam-Konformation zurückzuführen ist.

Die 7-desoxygenierten Derivate **15a** und **15b** stellen einen neuen Verbindungstyp dar, der sich zunächst nicht anhand der bekannten post-PKS-Modifizierungssequenz der Ansamitocin-Biosynthese erklären lässt. Prinzipiell erfordert die Darstellung dieser Verbindungen aus den Vorläufern **11a/b** eine Eliminierung des Substituenten an C-7 mit anschließender oder konzertiert erfolgender Reduktion zur Methylen-Einheit (Schema 8, A).



Schema 8: (A) Biosynthese-Vorschlag zur Desoxygenierung der Proansamitocin-Derivate **11a/b** und **16a/b** im Vergleich zur (B) Biosynthese des aktivierten Desoxyzuckers **18** aus NDP-D-Glukopyranose **17** durch eine NAD⁺-abhängige Nucleotidylphosphohexose-(NDP-Hexose)-4,6-Dehydratase (modifiziert nach HE *et al.*).^{53a}

Vergleichbare Transformationen sind aus der Biosynthese von Desoxyzuckern bekannt,⁵³ wobei hier beispielhaft die Dehydratisierung und Reduktion eines in vergleichbarer β -Position zur aktivierenden Carbonylgruppe liegenden Alkohols angeführt wird (Schema 8, B).

Bei diesen Überlegungen stellt sich allerdings die Frage, warum entsprechende Verbindungen nicht schon aus der Fermentation von *A. pretiosum* Δ asm12/21 isoliert werden konnten. Als Hauptmerkmal der Unterschiede zwischen *A. pretiosum* Δ asm12/21 und HGF073 sei auf die Anwesenheit der aktiven 7-*O*-Carbamoyltransferase *Asm21* hingewiesen. Mechanistisch betrachtet wird der 7-Alkohol durch Carbamoylierung in eine gute Fluchtgruppe überführt. Somit würde die isolierte Verbindung **16b** ein Intermediat auf dem Weg zu **15b** darstellen. Die geringen Ausbeuten für das korrespondierende Diastereomer **15a** könnten somit als Ergebnis einer ineffizienten Carbamoylierung von Edukt **11a**, gefolgt von einer schnellen Umsetzung zum Endprodukt **15a** interpretiert werden. Vergleichbare 7-desoxygenierte Produkte konnten im Rahmen dieser Arbeit nach Fermentation der zur 7-*O*-Carbamoylierung fähigen Stämme *A. pretiosum* HGF073 und HGF052 isoliert werden (Kapitel 4.1.2 und 4.1.5). Zur Überprüfung der Hypothese wurde das isolierte Proansamitocin-Derivat **16b** in einem massenspektrometrisch verfolgten Experiment erneut an *A. pretiosum* HGF073 verfüttert. Während nach der Fermentation im gereinigten Rohextrakt das erwartete Produkt **15b** detektiert werden konnte, wurde neben Edukt **16b** zudem der freie Alkohol **11b** gefunden. Insbesondere die Anwesenheit der letzteren Komponente zeigt, dass sich das hochkomplexe System der Biotransformation mit Bakterienstämmen oft nicht zur Beantwortung spezieller mechanistischer Fragen eignet. Eine eindeutige Antwort zur Biogenese der Verbindungen **15a/b** aus **11a/b**, möglicherweise via **16a/b**, könnte somit nur in Nebenreaktions-freien *in vitro*-Systemen erlangt werden.

4.1.1.5 Biologische Aktivitäten

Die mutasynthetisch erzeugten Proansamitocin-Derivate wurden von FLORENZ SASSE am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung⁵⁴ auf ihre biologische Aktivität untersucht (Tabelle 1). Für keines der unter Abschnitt 4.1.1.3 und 4.1.1.4 beschriebenen Derivate konnte *in vitro* eine zytotoxische Aktivität gegenüber tierischen und humanen Zellen ermittelt

⁵³ a) X. He, H.-W. Liu, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, 6, 590-597; b) A. Kirschning, A. F.-W. Bechthold, J. Rohr, *Chemical and biochemical aspects of deoxysugars and deoxysugar oligosaccharides*, in *Topics in Current Chemistry*, Vol. 188, Springer-Verlag, Heidelberg **1997**, 1-84.

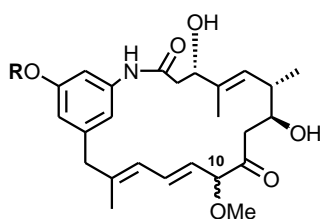
⁵⁴ Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung GmbH, Inhoffenstraße 7, D-38124 Braunschweig.

werden.⁵⁵ Dies steht in Übereinstimmung zu den einleitend in Kapitel 2.1 diskutierten Struktur-Aktivitätsbeziehungen.

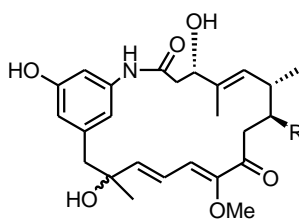
Tabelle 1: IC₅₀-Werte [nM] der Mutaprodukte im Vergleich zum natürlichen Ansamitocin P-3 **1c**.

Zelllinien: L-929 (Mausfibroblasten), KB-3-1 (Gebärmutterhalskarzinom), U-937 (Leukämie), A-431 (Hautkarzinom), SK-OV-3 (Eierstockadenokarzinom), PC-3 (Prostataadenokarzinom), MCF-7 (Brustadenokarzinom), HUVEC (Nabelschnurendothelzellen).

Proansamitocin-Derivate:



7 [R = H, 10-(*R*)]
9 [R = H, 10-(*S*)]
10 [R = Me, 10-(*R*)]



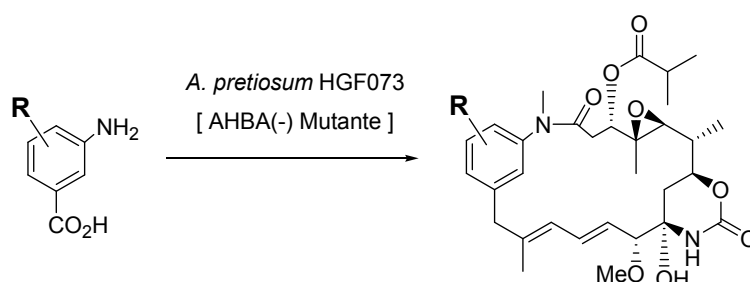
11a [R = OH, Diastereomer #1]
11b [R = OH, Diastereomer #2]
15a [R = H, Diastereomer #1]
15b [R = H, Diastereomer #2]
16b [R = OC(O)NH₂, Diastereomer #2]

Zelllinie	AP-3	7	9	10	11a	11b	15a	15b	16b
L-929	0.2	>900	>90	>900	>900	>900	>900	>900	>800
KB-3-1	0.17	>900		>900	>900	>900			
U-937	0.01	>900	>900	>900	>900	>900	>900	>900	>800
A-431	0.08	>900	>90	>900	>900	>900	>900	>900	>800
SK-OV-3	0.05	>900	>900	>900	>900	>900	>900	>900	>800
PC-3	0.06	>900	>900	>900	>900	>900	>900	>900	>800
MCF-7		>900	>900	>900	>900	>900	>900	>900	>800
HUVEC	0.02		>900				>900	>900	>800

⁵⁵ Die Daten zur zytotoxischen Aktivität wurden zur Drucklegung der genehmigten Dissertation vervollständigt.

4.1.2 Mutasynthetische Derivatisierungen mit AHBA-Derivaten

Die Strukturklasse der Maytansinoide wurde in den mittlerweile 38 Jahren seit ihrer Entdeckung durch verschiedene total- und semisynthetische Ansätze bearbeitet. Zudem wurden Mikroorganismen im Rahmen von Biotransformationsexperimenten zur Derivatisierung dieser Substanzen genutzt.^{8,56} Wie bereits einleitend in Kapitel 2.1 beschrieben wurde, beschränkten sich diese Variationen allerdings hauptsächlich auf durch Heteroatome oder benachbarte Aktivierung gekennzeichnete Positionen, während Veränderungen der Grundstruktur auf diesem Wege als prinzipiell nicht zugänglich erscheinen. Einen neuen Ansatz zur Derivatisierung von Substanzen der Maytansinstrukturklasse stellt die Übertragung des einleitend beschriebenen, mutasynthetischen Konzepts auf die Ansamitocin-Biosynthese durch *Actinosynnema pretiosum* dar (Schema 9).



Schema 9: Idealisierte Darstellung der mutasynthetischen Erzeugung von Ansamitocin P-3-Derivaten mit *Actinosynnema pretiosum* HGF073 auf Basis von Aminobenzoesäure-Mutasynthonen.

Die von der Arbeitsgruppe FLOSS bereitgestellte Mutante *A. pretiosum* HGF073 ermöglicht durch das Fehlen der internen Produktion des natürlichen und für die Ansamitocin-Biosynthese essenziellen Synthons AHBA **6** (AHBA(-)-Phänotyp) einen Zugang zu Derivaten mit neuen Attributen.³⁴

⁵⁶ Eine Übersicht gibt: A. Kirschning, K. Harmrolfs, T. Knobloch, *C. R. Chim.* **2008**, *11*, 1523-1543.

4.1.2.1 Vorarbeiten

Insbesondere Derivate der 3-Aminobenzoessäure erwiesen sich in Arbeiten der Gruppen KIRSCHNING und GROND als erfolgsversprechende Vorläufer (Mutasyntnone) zur mutasynthetischen Erzeugung von Ansamitocin-Derivaten, welche zu neuen Varianten des arylischen Strukturelements führten.³⁵ Hinsichtlich der hauptsächlich von TAFT³⁶ und BRÜNJES³⁷ durchgeführten Arbeiten sei in ihrer Vollständigkeit auf die entsprechende Literatur verwiesen. Abbildung 11 stellt die erfolgreich umgesetzten Mutasyntnone den artverwandten, und aufgrund sterischer, elektronischer oder chemischer Attribute nicht prozessierten Aromaten gegenüber.

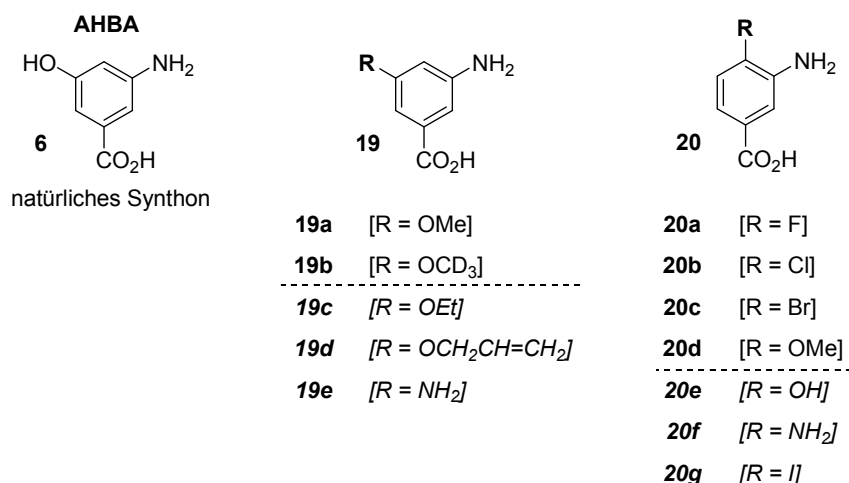
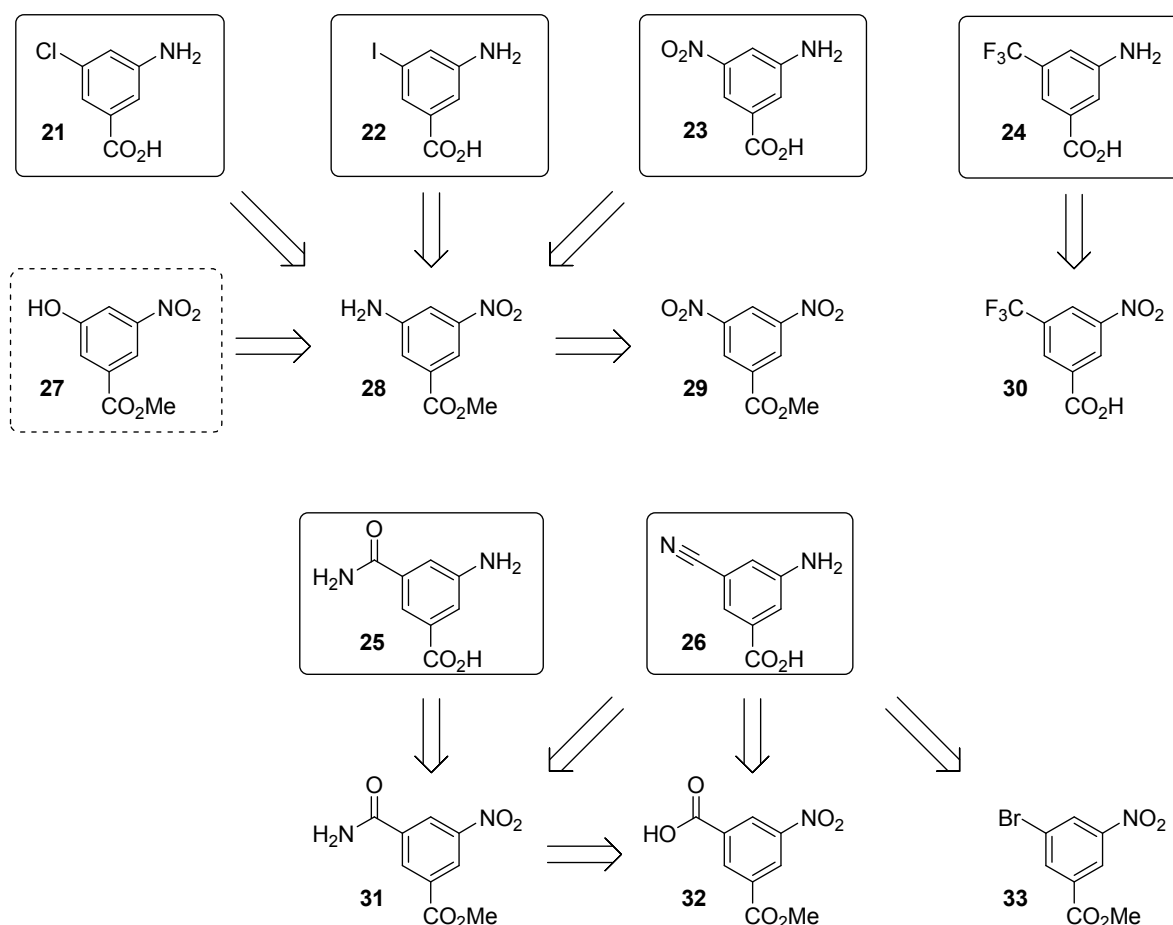


Abbildung 11: Ausgewählte Vorarbeiten zur Mutasyntthese von Ansamitocin-Derivaten mit *A. pretiosum* HGF073.³⁵⁻³⁷ Normal gedruckte Mutasyntnone konnten zu neuen Ansamitocinen prozessiert werden, während für kursiv dargestellte Vorläufer kein Umsatz festgestellt wurde.

Während vier an Position 4 substituierte 3-Aminobenzoessäuren **20** zu neuen Ansamitocin-Derivaten umgesetzt werden konnten, wurde dies für an Position 5 substituierte Mutasyntnone **19** nur in zwei Fällen nachgewiesen (**19a-b**). Dies mag zunächst verwundern, da dieses Substitutionsmuster dem des natürlichen Vorläufers AHBA **6** gleicht. Bei genauerer Betrachtung fällt jedoch auf, dass sterisch anspruchsvolle Phenoether (**19a-d**) und eine basische Anilinfunktion (**19e**) als formale *ipso*-Substituenten der Hydroxylfunktion von AHBA **6** untersucht wurden.

4.1.2.2 Synthese der Mutasyntnone

In Anlehnung an die Mutasynton-Reihe **19** wurden für die vorliegende Arbeit solche 3-Aminobenzoesäuren als Untersuchungsobjekte für eine mutasyntetische Prozessierung mit *A. pretiosum* HGF073 gewählt, die zusätzlich neutrale Substituenten an Position 5 aufweisen. Hierbei sollte zudem ein breites Substituentenspektrum mit verschiedenen sterischen und elektronischen Eigenschaften betrachtet werden (Schema 10).



Schema 10: Retrosynthetische Betrachtungen zur Synthese der Mutasyntnone **21-26**, sowie des zur Synthese von fortgeschrittenen Vorläufern geeigneten 3-Hydroxy-5-nitrobenzoesäuremethylesters **27**.

Das mit einem Trifluormethyl-Substituenten ausgestattete Mutasyntnon **24** sollte reduktiv aus der kommerziell erhältlichen 3-Nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäure (**30**) erzeugt werden. Grundsätzlich sind bei der Synthese von Aminobenzoesäuren jedoch als Methylester geschützte Intermediate vorzuziehen, insofern auf diesem Weg eine Reinigung von Zwischenstufen vereinfacht, und die Problematik der amphoteren Eigenschaften dieser Aminosäuren auf die letzten Stufen beschränkt wird.

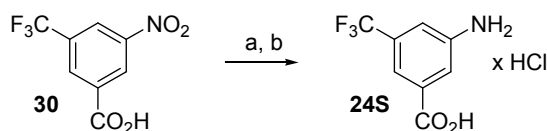
Die Synthese der halogenhaltigen Mutasyntnone **21-22** sollte durch SANDMEYER-Reaktionen erfolgen. Das gemeinsame Edukt **28** würde durch reduktive Desymmetrisierung des kommerziell verfügbaren 3,5-Dinitrobenzoesäuremethylesters (**29**) zugänglich sein und zudem noch zur Darstellung der entsprechenden Benzoesäure **23** genutzt werden. Des Weiteren würde diese Syntheseroute durch eine Überführung der Aminogruppe zum Phenol einen Nitro-, „geschützten“ AHBA-analogen Baustein **27** für die Synthese von komplexeren Ansamycin-Grundstrukturen bieten.

Die Darstellung der 3-Amino-5-cyanobenzoesäure (**26**) sollte aus dem kommerziell erhältlichen, unsymmetrisch geschützten Isophthalsäurederivat **32** erfolgen, wobei verschiedene Amidierungs- und Dehydratisierungsrouten in Betracht gezogen werden sollten. Eine weitere Möglichkeit der Darstellung von Mutasynton **26** durch eine Palladium-katalysierte Cyanierung sollte mit Hilfe des von KIRSTEN HARMROLFS bereitgestellten Bromaromaten **33** erprobt werden, deren Arbeiten zudem die Brom-Variante der Mutasyntnone **21-22** beinhalten.⁵⁷

Das durch Amidierung des Isophthalsäurederivats **32** dargestellte Intermediat **31** würde weiterhin der Synthese des Isophthalamsäure-Mutasyntons **25** dienen.

Die Mutasyntnone sollten bevorzugt als entsprechende Hydrochlorid-Organosalze dargestellt werden (Nummerierungszusatz: ##S). Die Salze ermöglichen durch erhöhte Wasserlöslichkeit eine vereinfachte Substratzugabe im Rahmen von Mutasyntneseexperimenten.

Die Reduktion des Nitroaromaten **30** gelang mittels Palladium-katalysierter Hydrierung, wobei das nach Entfernung des Katalysators erhaltene Rohprodukt zur Reinigung direkt aus halbkonzentrierter Salzsäure umkristallisiert, und das Hydrochlorid des Trifluormethylaromaten **24S** erhalten wurde (Schema 11).

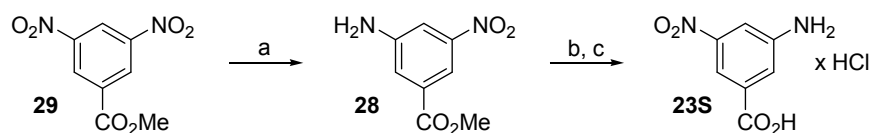


Schema 11: Synthese von Hydrochlorid **24S**: Bedingungen: a) H_2 , Pd/C, MeOH, RT; b) HCl [6 M], Δ , 36 % über 2 Stufen.

Zur Darstellung der Verbindungen **21-23** musste zunächst eine reduktive Desymmetrisierung der 3,5-Dinitroverbindung **29** zum 3-Amino-5-nitroaromaten **28** erfolgen. Neben dem

⁵⁷ K. Harmrolfs, Dissertation, *Chemische und chemoenzymatische Synthesezugänge zu neuen Ansamitocin-Derivaten*, Universität Hannover, Hannover **2010**.

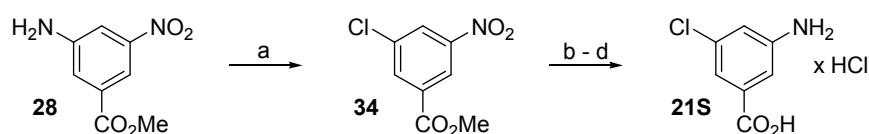
klassischen Verfahren unter Verwendung von Schwefelwasserstoff⁵⁸ ist für diese Reaktion auch die Palladium-vermittelte Ammoniumformiat-Transferhydrierung von Methylester **29** in der Literatur beschrieben,⁵⁹ welches im Rahmen dieser Arbeit für die Synthese der Schlüsselverbindung **28** verwendet wurde (Schema 12).



Schema 12: Synthese von Hydrochlorid **23S**. Bedingungen: a) HCO_2H , Pd/C, NEt_3 , Δ , 53 %; b) LiOH, MeOH/ H_2O , RT; c) HCl [6 M], Δ , 49 % über 2 Stufen.

Die Verseifung der unsymmetrischen Verbindung **28** zur entsprechenden Benzoesäure gelang unter Verwendung von Lithiumhydroxid. Die resultierende, amphotere Aminobenzoesäure konnte dann im leicht sauren Milieu (pH = 4-6; isoelektrischer Punkt der Aminobenzoesäuren) aus dem wässrigen Reaktionsrückstand extrahiert und durch Umkristallisation aus halbkonzentrierter Salzsäure in das entsprechende Hydrochlorid **23S** überführt werden.

Die Anilinfunktion des Methylesters **28** wurde mittels SANDMEYER-Reaktion⁶⁰ unter Diazotierung in einer schwefelsauren Kupfer(I)chlorid-Katalysatorlösung in einen Chlor-Substituenten überführt (Schema 13). Die Reduktion der erhaltenen Nitroverbindung **34** gelang in essigsaurer Lösung mit Zinn(II)chlorid als selektivem Reduktionsmittel.



Schema 13: Synthese von Hydrochlorid **21S**. Bedingungen: a) i. CuCl , H_2SO_4 , H_2O , Δ , ii. NaNO_2 , Δ , dann RT, 23 %; b) $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, AcOH, EtOAc, Δ , 90 %; c) LiOH, MeOH/ H_2O , RT; d) HCl [6 M], Δ , 73 % über 2 Stufen.

Durch die Anwesenheit der Methylester-Schutzgruppe bedingt konnte eine Extraktion in leicht basischem Milieu erfolgen, was eine einfache Entfernung des ausgefallenen

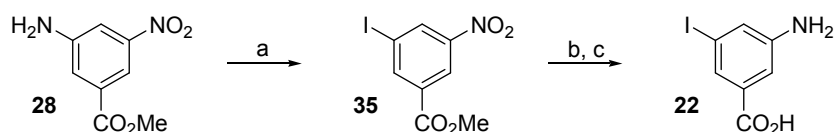
⁵⁸ J. B. Cohen, D. McCandlish, *J. Chem. Soc., Trans.* **1905**, 87, 1257-1272.

⁵⁹ M. O. Terpkö, R. F. Heck, *J. Org. Chem.* **1980**, 45, 4992-4993.

⁶⁰ T. Sandmeyer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1884**, 17, 1633-1635, 2650-2653; T. Sandmeyer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1885**, 18, 1492-1496; T. Sandmeyer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1887**, 20, 1633-1635, 1494-1497.

Zinnhydroxids („Zinnschlämme“) ermöglichte. Nach erfolgter Verseifung gelang durch Umkristallisierung aus halbkonzentrierter Salzsäure die Darstellung des Hydrochlorids **21S**.

Die Synthese der 3-Amino-5-iodbenzoesäure (**22**) erfolgte in analoger Weise durch eine SANDMEYER-Reaktion⁶⁰ als Schlüsselschritt (Schema 14). Für die Einführung des Iod-Substituenten wurde auf das literaturbekannte Verfahren zur Umsetzung der entsprechenden freien Benzoesäure zurückgegriffen.⁶¹ Ausgehend vom erhaltenen Methylester **35** gelang die Darstellung des Mutasythons **22** nach Zinn(II)chlorid-vermittelter Reduktion der Nitrogruppe und abschließender Verseifung des Methylesters.



Schema 14: Synthese von Benzoesäure **22**. Bedingungen: a) i. $K_2S_2O_5$, HNO_3 , $0\text{ }^\circ\text{C}$, ii. KI , I_2 , $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, iii. $85\text{ }^\circ\text{C}$, 41 %; b) $SnCl_2 \cdot 2H_2O$, $AcOH$, $EtOAc$, Δ , 72 %; c) $LiOH$, $MeOH/H_2O$, RT , 87 %.

Auf eine Überführung des Produkts **22** in das entsprechende Hydrochlorid wurde verzichtet, da die Verbindung bereits durch Umkristallisierung aus Methanol/Wasser in hoher Reinheit vorlag.

Während die von TAFT,³⁶ BRÜNJES,³⁷ FRENZEL⁶² und MEYER⁶³ ausgearbeiteten Syntheserouten zu fortgeschrittenen Ansamitocin-Vorläufern und Derivaten vor allem säurelabile Oxycarbonyle (Boc, Teoc) als Schutzgruppen für die Anilin-Funktion der Zwischenstufen beschreiben,⁶⁴ würden die chemischen und elektronischen Eigenschaften einer reduktiv freizusetzenden Nitro-Schutzgruppe eine erweiterte Kompatibilität zu bestimmten Reaktionsbedingungen bieten.

Die Synthese eines entsprechenden Vorläufers gelang ausgehend von 3-Amino-5-nitrobenzoesäuremethylester (**28**) (Schema 15). Die Verwendung der literaturbekannten Vorschrift zur Umsetzung der entsprechenden freien Benzoesäure unter Diazotierung und Verkochen zum Phenol⁶⁵ führte zur partiellen Hydrolyse des Methylesters, so dass das erhaltene Rohprodukt mittels Thionylchloridaktivierung erneut verestert werden musste.

⁶¹ F. B. McAlister, J. Kenner, *J. Chem. Soc.* **1928**, 1913-1916.

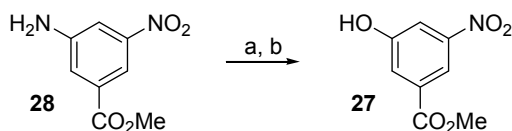
⁶² T. Frenzel, Dissertation, *Studien zur chemoenzymatischen Synthese von Maytansinoid-Analoga: Synthese von seco-Proansamitocin*, Universität Hannover, Hannover **2005**.

⁶³ A. Meyer, Dissertation, *Chemische und chemoenzymatische Studien zu hybriden Ansamycin-Antibiotika / Synthese von Proansamitocin*, Universität Hannover, Hannover **2006**.

⁶⁴ Teoc = 2-(Trimethylsilyl)ethoxycarbonyl.

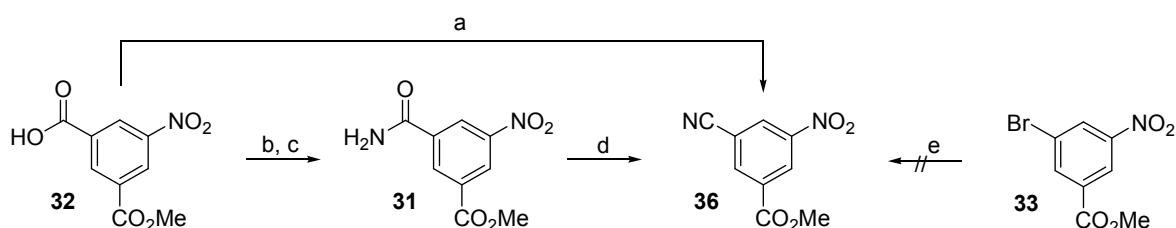
⁶⁵ D. J. Abraham, D. M. Gazze, P. E. Kennedy, M. Mokotoff, *J. Med. Chem.* **1984**, 27, 1549-1559.

Eine abschließende Umkristallisation aus Methanol/Wasser lieferte Methylester **27**, der in von MONIKA VOGT durchgeführten Studien zur Synthese eines Geldanamycin-Vorläuferderivats Anwendung fand.⁶⁶



Schema 15: Synthese von Methylester **27**. Bedingungen: a) i. H_2SO_4 , NaNO_2 , H_2O , 0°C , ii. H_2SO_4 , H_2O , Δ ; b) SOCl_2 , MeOH , $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 58 % über 2 Stufen.

Für die Darstellung einer Nitril-funktionalisierten Aminobenzoesäure **26** wurden verschiedene Synthesemethoden erprobt (Schema 16).



Schema 16: Synthese der Methylester **31** und **36**. Bedingungen: a) $\text{SO}_2(\text{NH}_2)_2$, SOCl_2 , Sulfolan, Δ (μw), 75 %; b) SOCl_2 , DMF, PhMe, Δ ; c) $\text{NH}_3(\text{g})$, CH_2Cl_2 , RT, 85 % über 2 Stufen; d) i. DBU, CH_2Cl_2 , RT, ii. $\text{PhOP}(\text{O})\text{Cl}_2$, RT, 95 %; e) $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, Na_2CO_3 , $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, DMAc, $80-120^\circ\text{C}$ (μw), kein Umsatz.

Hierbei boten sich von dem günstig zu erwerbenden Isophthalsäuremonomethylester (**32**) ausgehende Amidierungs-/Dehydratisierungssequenzen an, wobei zunächst auf eine literaturbekannte Eintopfsynthese zur Darstellung des Methylesters **36** zurückgegriffen wurde.⁶⁷ Die beschriebenen konventionellen Hochtemperaturbedingungen⁶⁸ wurden durch Mikrowellen-vermitteltes Heizen ersetzt. Während dieses Verfahren recht gute Ausbeuten lieferte, so sprechen die hohen Kosten der verwendeten Amidquelle (Sulfamid) gegen dessen Anwendung.

Auf milderem Weg wurde die Darstellung von Methylester **36** in zwei Schritten realisiert (Schema 16). Das nach Umsetzung von Isophthalsäuremonomethylester **32** mit

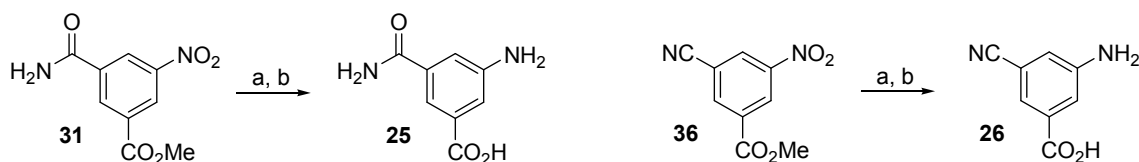
⁶⁶ M. Vogt, Dissertation, *Umpolung von Allyl-Palladium-Komplexen und Anwendung in der Synthese von Naturstoff-Fragmenten*, Universität Hannover, Hannover **2010**.

⁶⁷ C. Dahlen, J. Auernheimer, A. Meyer, A. Enderle, S. L. Goodman, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6649-6652; J. Auernheimer, Dissertation, *Funktionalisierung künstlicher Oberflächen mit Integrinliganden zur Stimulierung integrinvermittelter Zelladhäsion*, Technische Universität München, München **2005**.

⁶⁸ Refluxierendes Sulfolan entspricht einer Temperatur von 285°C .

Thionylchlorid erzeugte Säurechlorid wurde durch Ammoniakgas in das entsprechende Amid **31** überführt. Diese Verbindung besitzt eine sehr limitierte Löslichkeit in vielen für die säulenchromatographische Reinigung verwendeten Lösungsmitteln. Da das Rohprodukt jedoch nur Ammoniumchlorid als Verunreinigung enthielt, konnten das reine Amid **31** nach wässrigen und methanolischen Waschschritten erhalten werden. Die Dehydratisierung zum Nitril **36** gelang daraufhin anhand des von KUO *et al.* beschriebenen Verfahrens⁶⁹ mit Phenyldichlorphosphat und DBU in exzellenter Ausbeute.

Angeregt durch die von WEISSMAN und BELLER publizierten Verfahren zur Palladium-vermittelten direkten Cyanierung von Arylhalogeniden⁷⁰ wurden Versuche zur entsprechenden Darstellung von Methylester **36** unternommen. Ausgehend von Arylbromid **33** wurde eine Umsetzung entsprechend des WEISSMAN-Protokolls^{19a} unter Verwendung von Palladium(II)acetat und gelbem Blutlaugensalz als Cyanidquelle versucht (Schema 16). Trotz Variation des Temperaturparameters konnte bei den unter Mikrowellen-vermitteltem Heizen durchgeführten Versuchen keine Bildung des Produkts **36** festgestellt werden. Hierbei ist zu erwähnen, dass für dieses Verfahren üblicherweise elektronenreichere Aromaten als das vorliegende Nitroaren **33** verwendet werden. Aufgrund der guten Ausbeuten der Amidierungs-/Dehydratisierungs-Syntheseroute wurden keine weiteren Versuche zur Optimierung der Reaktion unternommen.



Schema 17: Synthese der Benzoesäuren **25** und **26**. Bedingungen: a) SnCl₂·2H₂O, AcOH, EtOAc, Δ, von **31**: 81 %, von **36**: 87 %; b) LiOH, MeOH/H₂O, RT, **25**: 33 %, **26**: 78 %.

Die Darstellung der Mutasynthone **25** und **26** gelang durch Zinn(II)chlorid-vermittelte Freisetzung der Anilin-Funktion, gefolgt von der üblichen Verseifung der Methylester (Schema 17). Während Nitril **26** bei geeignetem pH-Wert (pH = 4-6) extraktiv gewonnen und anschließend durch Umkristallisierung aus Methanol/Wasser gereinigt wurde, setzte unter gleichen Bedingungen die Kristallisation von Amid **25** bereits nach Einstellen des pH-Werts ein. Erneute Umkristallisierung des Präzipitats aus Methanol/Wasser lieferte die polare

⁶⁹ C.-W. Kuo, J.-L. Zhu, J.-D. Wu, C.-M. Chu, C.-F. Yao, K.-S. Shia, *Chem. Commun.* **2007**, 301-303.

⁷⁰ a) S. A. Weissman, D. Zwerge, C. Chen, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 1508-1510; b) M. Sundermeier, A. Zapf, M. Beller, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 1700-1703; c) T. Schareina, A. Zapf, M. Beller, *J. Organomet. Chem.* **2004**, *689*, 4576-4583.

Isophthalamsäure **25** in hoher Reinheit. Auf eine Überführung in korrespondierende Hydrochloride unter den harschen Bedingungen halbkonzentrierter Salzsäure wurde für die Mutasyntnone **25** und **26** aus Stabilitätsgründen verzichtet.

4.1.2.3 Verfütterungen

Für mutasynthetische Studien zur Erzeugung von neuen Ansamitocin-Derivaten mit *A. pretiosum* HGF073 standen nun Mutasyntnone mit verschiedenen Eigenschaften zur Verfügung (Abbildung 12). Die Mutasyntnone **37S** und **38S** wurden durch SIMONE EICHNER bereitgestellt, beziehungsweise auf bekannte Weise synthetisiert.⁷¹ Als Referenz für Verfütterungsstudien konnte zudem das natürliche Synthon AHBA **6S** als Hydrochlorid verwendet werden.³⁶

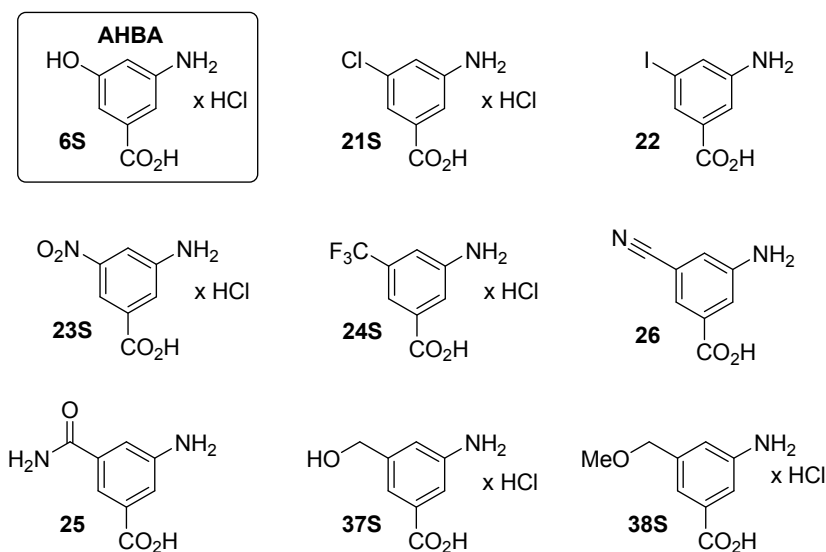


Abbildung 12: Für mutasynthetische Studien mit *A. pretiosum* HGF073 verwendete Mutasyntnone im Vergleich zum als Referenz verfütterten natürlichen Synthon AHBA **6S**.

Bevor auf die Ergebnisse der mutasynthetischen Arbeiten eingegangen wird, sollen zunächst die grundlegenden Verfahrensweisen und Überlegungen zu Mutasyntneseexperimenten mit *A. pretiosum* HGF073 erläutert werden.

⁷¹ S. Eicher, Diplomarbeit, *Zugänge zu Geldanamycin-Derivaten über Mutasyntnese*, Universität Hannover, Hannover **2007**.

4.1.2.3.1 Grundlegendes zu Mutasyntesen

Erste Mutasynteseversuche mit neuen AHBA-Derivaten wurden zunächst in Schüttelkulturvolumen von 45 mL durchgeführt (vgl. Abbildung 13), wobei die Mutasynthe üblicherweise in Mengen von 1.25 mmol pro Liter Fermentationsansatz zu den Kulturen gegeben wurden. Dies entspricht einem Bedarf von rund 10 mg Mutasynton für einen Mutasyntesetestansatz. Polare Hydrochloride wie AHBA **6S** konnten zur Supplementierung in Wasser gelöst werden, während unpolare Mutasynthe nur durch Zusatz von Dimethylsulfoxid (DMSO) als Kosolvens (>50 % (v/v)) gelöst, und nach Sterilfiltration den Kulturen verabreicht werden konnten.

Die DMSO-Belastung für diese Kulturen variierte damit von Fall zu Fall zwischen 2 % und 6 % (v/v) des Schüttelkulturvolumens. Wie aus der Literatur bekannt, kann Zusatz von DMSO innerhalb dieses Konzentrationsbereich einen stimulierenden Effekt auf die Sekundärmetabolitproduktion von Actinomyceten-Stämmen ausüben.⁷² Es ist allerdings zu beachten, dass sich die beschriebenen Studien auf Wildtyp-Produzentenstämme beziehen. Systematische Studien zur Abwägung der positiven und möglicherweise synergistischen Effekte von Vorläufersupplementation und DMSO-Eintrag im Rahmen von Mutasyntesen mit *A. pretiosum* HGF073 wurden in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht durchgeführt.

Dem Hauptkulturmedium wurde, wie bereits in Kapitel 4.1.1 beschrieben, grundsätzlich L-Valin (3 g/L) hinzugefügt. Dieses Additiv wirkt stimulierend auf die Ansamitocin-Produktion und sorgt durch Vorläufer-Dirigierung für das Auftreten der Isobuttersäure-esterseitenkette (P-3 Typ, vgl. **1c**) als Hauptkomponente bei 3-*O*-acylierten Ansamitocin-Derivaten.^{38,41} Für eine tiefer gehende Diskussion der Mechanismen und Effekte von Aminosäure-Stimulantien wird auf Kapitel 4.1.3 verwiesen.

Eine Diversifikation des Produktspektrums durch die variable Cosubstratnutzung der entsprechenden Acyltransferase *Asm19* ist insbesondere im Rahmen von Mutasyntesen nicht wünschenswert. Im Vergleich zur Umsetzung des natürlichen Synthons AHBA **6** ergeben Mutasynthe üblicherweise deutlich geringere Produktausbeuten,³⁵ was die Isolierung von ausreichenden Mengen zur vollständigen NMR-spektroskopischen Charakterisierung erschwert.

⁷² a) G. Chen, G.-Y.-S. Wang, X. Li, B. Waters, J. Davies, *J. Antibiot. (Tokyo)* **2000**, *53*, 1145-1153;
b) A. R. Butler, E. Cundliffe, *J. Ind. Microbiol. Biot.* **2001**, *27*, 46-51.

Zu Beginn dieser Arbeit beruhte das etablierte Verfahren zur Supplementierung von Mutasyntonen auf der portionsweisen Zugabe dieser Vorläufer zu Schüttelkulturen. Die Zufütterung der entsprechend angelösten Mutasyntone wurde nach 3 Tagen der Kultivierung begonnen, wobei die Gesamtmenge in drei Portionen mit 24 Stunden-Intervall zu den Kulturen gegeben wurde. Diese gepulste Zugabe stellte zwar ein bequem durchführbares Verfahren dar, erschien jedoch durch die applizierten Konzentrationsstufen nicht als biomimetisch. In der Tat wurden üblicherweise weniger als 1 % der zugegebenen xenobiotischen Mutasyntone in Form von Ansamitocin-Derivaten isoliert,³⁵ während das natürliche Synthon AHBA zumindest eine achtfache Einbaueffizienz aufwies. Es war anzunehmen, dass die Schockzugabe von unnatürlichen AHBA-Derivaten eine Steigerung von Detoxifizierungsmaßnahmen durch das Bakterium bewirken könnte.



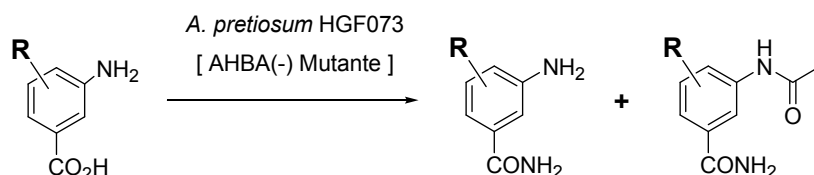
Abbildung 13: Kontinuierliche Verfütterung durch Spritzenpumpensysteme. Die Teflon[®]-Kapillare wird ohne Unterbrechung durch den mit einer Edelstahl-Kanüle durchbohrten Stopfen in den Fermentationskolben geführt.

Dies würde die Verfügbarkeit dieser Vorläufer für die Prozessierung im Rahmen der Ansamitocin-Biosynthese verringern und sich negativ auf die zu erzielenden Ausbeuten auswirken. Ein kontinuierliches Supplementierungsverfahren für die Vorläuferzugabe erschien als guter Lösungsansatz zur Optimierung der Fermentationsausbeuten.

Dieses Vorhaben wurde durch Entwicklung eines Spritzenpumpen-basierten Zufütterungsverfahrens realisiert, mit dem die steril in Spritzen gefüllte Mutasynton-Lösung über autoklavierbare Teflon[®]-Kapillaren mit Tefzel[®]-Anschlüssen über drei bis vier Tage verteilt direkt in die Fermentationsbrühe getropft werden konnte (Abbildung 13).

Ein vergleichbares System für Schüttelkulturen wurde für die Fermentationsoptimierung von *Escherichia coli* beschrieben,⁷³ während solch kontrollierte Substratzugaben üblicherweise nur Anwendung bei Fermentationen in Bioreaktoren finden.⁷⁴

Eine erste Anwendung für Mutasyntesen fand das entwickelte System in den Arbeiten von FLORIAN TAFT.³⁶ Anhand von zwei Beispielen konnte eine Ausbeutesteigerung von 55-66 % im Vergleich zum portionsweisen Zufütterungsverfahren erzielt werden.



Schema 18: Im Rahmen von Mutasyntesen mit *A. pretiosum* HGF073 auftretende Nebenprodukte^{36,57} Umwandlung der Mutasynthone zu den dargestellten Verbindungen wird Detoxifizierungsmaßnahmen zugeschrieben.

Weiterhin konnten in Arbeiten von TAFT und HARMROLFS Detoxifizierungsprodukte der zugefütterten Mutasynthone isoliert und charakterisiert werden.^{36,57} Hierbei wurden Amidierung der Benzoessäurefunktion und *N*-Acetylierung der Anilinfunktion festgestellt (Schema 18). Eine vergleichbare Amidierung von Zimtsäure durch Actinomyceten wurde von BRUNATI *et al.* beschrieben,⁷⁵ während die beobachtete *N*-Acetylierung aller Wahrscheinlichkeit nach auf die Aktivität von Arylamin-*N*-acetyltransferasen zurückzuführen ist.⁷⁶

Abbildung 14 zeigt im direkten Vergleich portionsweise und kontinuierliche Mutasynthonzugabe anhand von Chromatogrammen der mittels analytischer *reversed phase*-HPLC untersuchten Fermentationsüberstände. Während unter portionsweiser Zugabe intensivere Signale im polaren Bereich des Chromatogramms zu beobachten sind ($t_R < 8$ min), lassen sich im Fall einer kontinuierlichen Zugabe des Mutasynthons größere Signale im mittel- bis unpolaren Bereich feststellen ($t_R > 8$ min). Erstere Signale lassen sich unter anderem kleinen Verbindungen wie entsprechenden Detoxifizierungsprodukten zuordnen, während die später eluierenden Substanzen neuen Ansamitocin-Derivaten entsprechen.

⁷³ D. Weuster-Botz, J. Altenbach-Rehm, M. Arnold, *Biochem. Eng. J.* **2001**, 7, 163-170.

⁷⁴ Beispiel: K. F. Hansen, H. Degn, *Biotechnol. Tech.* **1996**, 10, 485-490.

⁷⁵ M. Brunati, F. Marinelli, C. Bertolini, R. Gandolfi, D. Daffonchio, F. Molinari, *Enzyme Microb. Tech.* **2004**, 34, 3-9.

⁷⁶ a) F. Rodrigues-Lima, J. Dairou, C. L. Diaz, M. C. Rubio, E. Sim, H. P. Spaink, J.-M. Dupret, *Mol. Microbiol.* **2006**, 60, 505-512; b) M. Payton, A. Mushtaq, T.-W. Yu, L.-J. Wu, J. Sinclair, E. Sim, *Microbiology* **2001**, 147, 1137-1147.

RP18-HPLC-UV $\lambda=248$ nm
Absorption [mV]

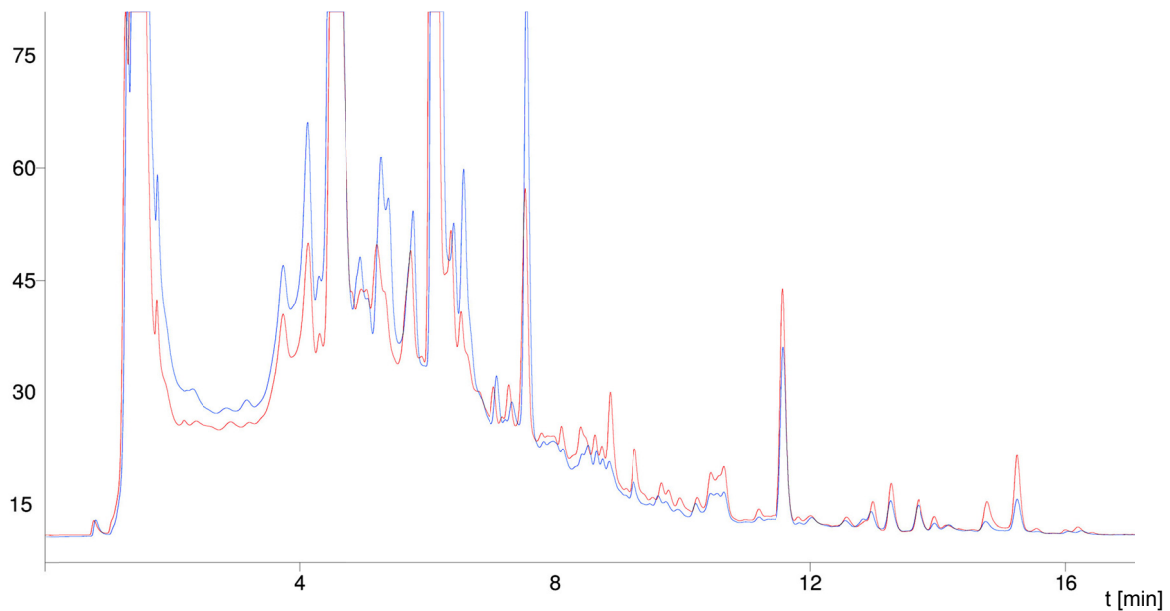


Abbildung 14: Vergleich zwischen portionsweiser (blau) und kontinuierlicher (rot) Supplementation von Mutasynton **21S** zu Kulturen von *A. pretiosum* HGF073 als HPLC-Chromatogramme der Fermentationsüberstände.⁷⁷

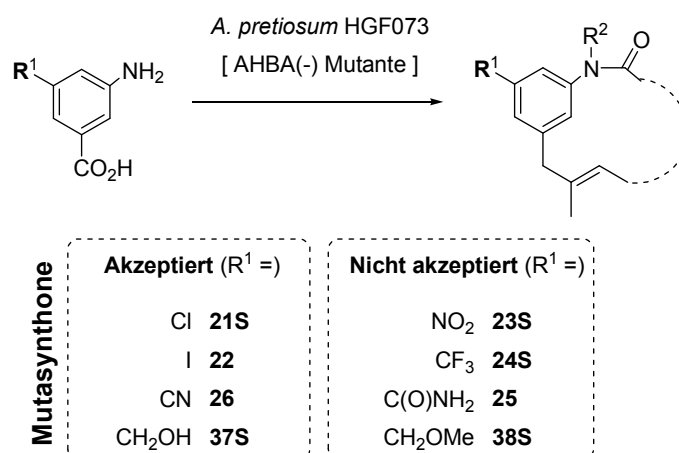
Für die Produktion von Ansamitocin-Derivaten zur anschließenden Isolierung wurde grundsätzlich das kontinuierliche Spritzenpumpenverfahren verwendet, während für erste Untersuchungen mit massenspektrometrischer Analytik mitunter auch die portionsweise Zugabe Anwendung fand. Nach zehn Tagen der Kultivierung wurden zunächst Proben der jeweiligen Fermentationsüberstände durch eine hochsensitive UPLC-MS(ESI)-Analytik untersucht. Wenn keine Produkte gefunden werden konnten, wurde die Fermentationsbrühe mit Ethylacetat extrahiert, der konzentrierte Rohextrakt über Kieselgel filtriert und das resultierende Konzentrat erneut massenspektrometrisch untersucht.

⁷⁷ Bedingungen: Säule C18-A, Elutionsprogramm A; s. Experimenteller Teil.

4.1.2.3.2 Ergebnisse der Mutasynteseversuche

Nach diesen grundlegenden Betrachtungen zu Mutasyntesen mit *A. pretiosum* HGF073 sollen nun die Ergebnisse der durchgeführten Verfütterungsexperimente diskutiert werden. Von acht untersuchten Mutasyntonon konnten vier dieser Vorläufer zu neuen Ansamitocinen prozessiert werden (Schema 19).

Für die biosynthetische Umwandlung von AHBA-Derivaten zu neuen Ansamitocinen muss das jeweilige Mutasynton vom Lademodul der Polyketidsynthese akzeptiert und anschließend durch PKS-Prozessierung verlängert werden, woraufhin eine abschließende Zyklisierung zu einem ersten freien Produkt erfolgen muss. Diese intermediär auftretenden Proansamitocin-Derivate können dann durch post-PKS-Prozessierungen dekoriert werden.



Schema 19: Kurzzusammenfassung der Mutasynteseergebnisse mit AHBA-Derivaten. Mutasynthone **21S**, **23S**, **24S**, **37S** und **38S** wurden als Hydrochloride verfüttert. $R^2 = \text{H}$ oder Me , siehe Schemata 21-22.

Ein negatives Ergebnis bedeutet allerdings nicht zweifelsfrei, dass die Biosynthesemaschinerie nicht in der Lage wäre, das entsprechende Mutasynton umzusetzen. Beispielsweise kann eine schnelle Derivatisierung oder Detoxifizierung der xenobiotischen Vorläufer durch konkurrierende Biosynthesewege ihren Einbau in Ansamitocine verhindert haben.

Zweifelsfrei wurden jedoch die 3-Aminobenzoesäuren mit Chlor- (**21S**), Iod- (**22**), Cyano- (**26**) und Hydroxymethyl-Substituenten (**37S**) in 5-Position zu neuen Ansamitocinderivaten prozessiert (Schema 19). Für entsprechende Mutasyntone mit Nitro- (**23S**), Trifluormethyl- (**24S**), Benzamid- (**25**) und Methoxymethyl-Substituenten (**38S**) konnte keine Bildung von neuen Ansamitocin-Derivaten nachgewiesen werden.

Mögliche Erklärungen für dieses Ergebnisse können zunächst durch Diskussion der jeweiligen Substituenteneigenschaften anhand des Konzepts der Bioisosterie gesucht werden, wobei die physikochemischen Eigenschaften der Substituenten betrachtet werden (Abbildung 15).⁷⁸

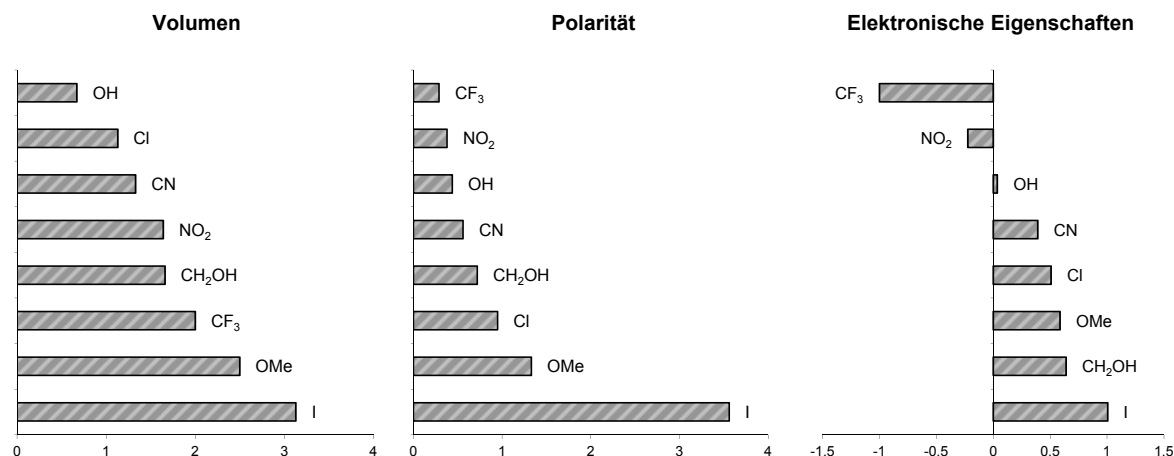


Abbildung 15: Physikochemische Eigenschaften verschiedener Substituenten (nach KIER *et al.*).⁷⁸
 Vereinfachte Interpretation: Volumen (V^{δ}): Je größer, desto voluminöser; Polarität (Q_v): Je größer, desto unpolarer; Elektronische Eigenschaften (E-State, sC; Bezogen auf substituiertes C-Atom eines Cyclohexans): Werte < 0 entsprechen elektronenziehenden, Werte > 0 elektronendonierenden Eigenschaften.

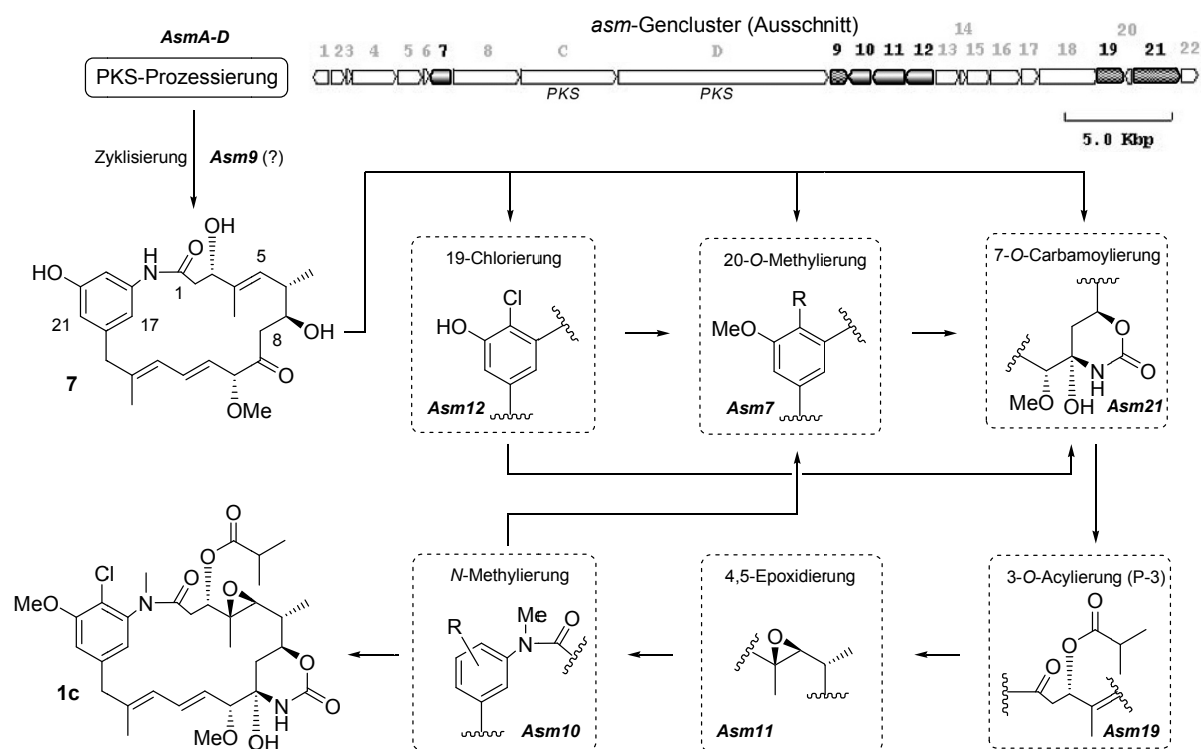
Die stark elektronenziehenden Eigenschaften der Trifluormethyl- und Nitro-Funktionen der Mutasyntnone **24S** und **23S** verhindern scheinbar eine Prozessierung zu neuen Ansamitocinen, obwohl sowohl Volumen als auch Polarität dieser Substituenten nicht eindeutig gegen eine Umsetzung sprechen. Ähnliches ist für Benzamid **25** zu vermuten, wobei hier auch eine ungünstige Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen in der enzymatischen Umgebung zu vermuten wäre. Überraschenderweise wird sogar der unpolare Iod-Substituent (**22**) akzeptiert, mit dem zusätzlich scheinbar ein Größenmaximum erreicht wird. Sowohl Polarität, als auch elektronische Eigenschaften des Benzyloxymethylethers **38S** sollten vergleichbar mit denen der akzeptierten Mutasyntnone **19a** und **37S** sein, wodurch folglich der sterische Anspruch des Substituenten als Grund für das negative Ergebnis zu identifizieren ist.

Während aus Nitril **26** hervorgehende Ansamitocin-Derivate nur in geringer Intensität im konzentrierten Extrakt massenspektrometrisch detektiert und charakterisiert werden konnten, so lieferte der sterisch anspruchsvolle Iodaromat **22** unter vergleichbaren Bedingungen

⁷⁸ L. B. Kier, L. H. Hall, *Chem. Biodiv.* **2004**, *1*, 138-151.

deutlich intensivere Signale für entstehende Derivate (Schema 21). Die Fermentation mit Chloraromat **21S** und Benzylalkohol **37S** versprach auf Basis dieser ersten Analytik allerdings weitaus größere Mengen, die sich für eine Isolierung eignen würden. Durch Wiederholung in größerem Maßstab konnten aus kombinierten Gesamtfermentationsvolumina von 945 mL (für **21S**) und 1.32 L (für **37S**) die dargestellten Ansamitocin-Derivate isoliert und vollständig charakterisiert, beziehungsweise massenspektrometrisch detektiert werden (Schemata 21-22).

Im Gegensatz zur Fermentation des natürlichen Vorläufers AHBA **6S** mit *A. pretiosum* HGF073 ergaben die Mutasyntesen allerdings kein dominierendes Hauptprodukt, sondern resultierten in einem Spektrum verschiedener Komponenten. Die auftretenden (Pro-)Ansamitocin-Derivate spiegeln zum Teil die bekannte post-PKS-Modifizierungssequenz wider (Schema 20). Zudem konnten zuvor unbekannte Veränderungen festgestellt werden.



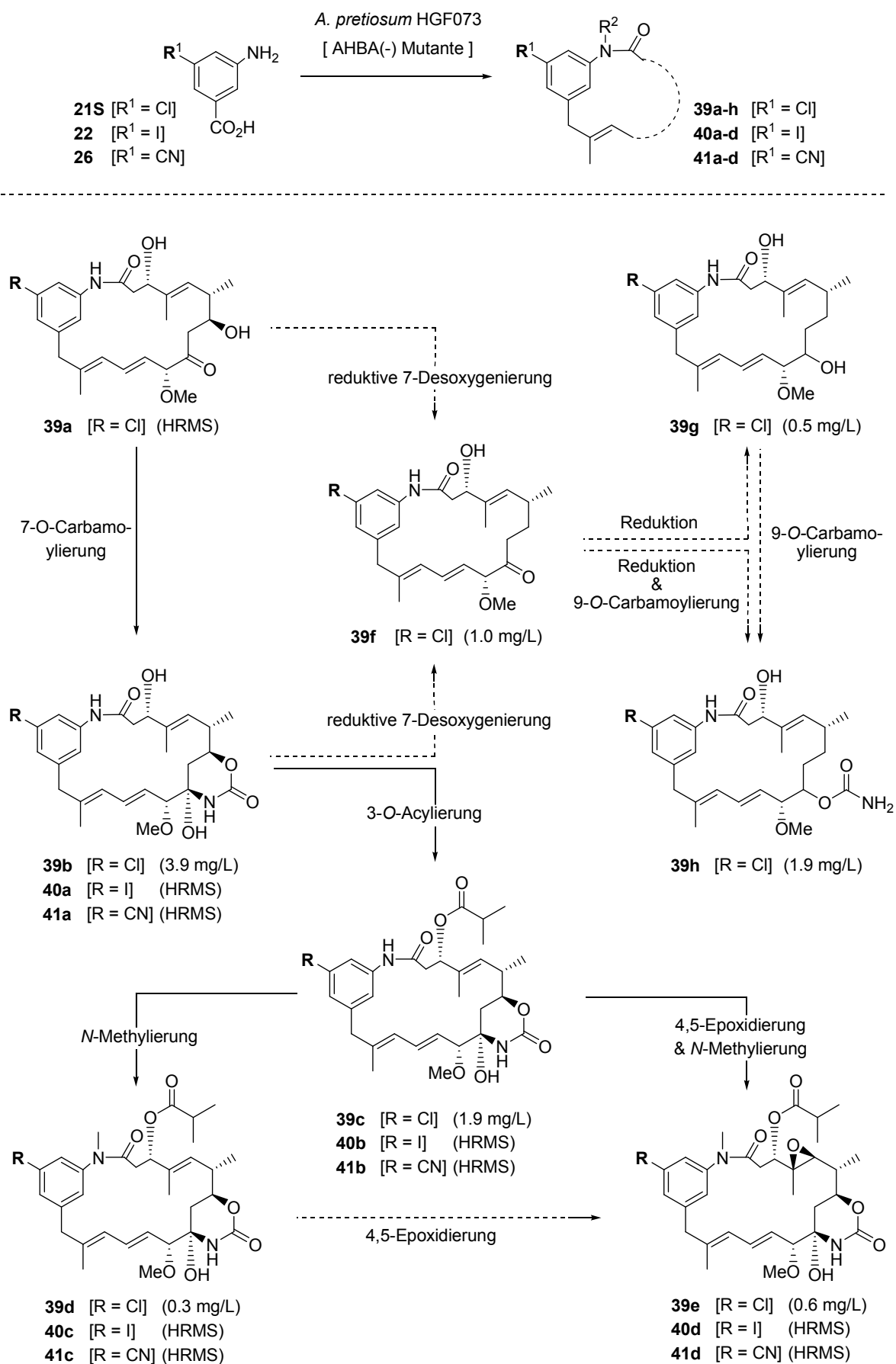
Schema 20: Mögliche Abfolgen und Enzyme der post-PKS-Modifizierungen im Rahmen der AP-3 **1c**-Biosynthese in *A. pretiosum* ssp. *auranticum* ATCC 31565, sowie Lage und Orientierung der zugehörigen Gene im *asm*-Gencluster (modifiziert nach YU *et al.*, SPITELLER *et al.*, MEYER *et al.*).^{25, 33, 35a}

Der von SPITELLER *et al.* veröffentlichte Vorschlag zur Abfolge der post-PKS-Modifizierungen basiert auf der Erstellung und Fermentation von Deletionsmutanten der post-PKS-Biosynthese.³³ Aus diesen Studien wurde abgeleitet, dass einige der involvierten

Enzyme nur eingeschränkte Substratflexibilität aufweisen. Bestimmte Modifizierungen müssen erfolgen, bevor das Intermediat vom nächsten Enzym der Biosynthesesequenz akzeptiert werden kann (Schema 20). Generell ist zu postulieren, dass die Akkumulation von Intermediaten an diesen linearen Wegpunkten der Sequenz aus einer ineffizienten Prozessierung des jeweiligen Mutaprodukts durch das für die nächste Umsetzung verantwortlichen Enzyms resultiert. Bei diesen Interpretationen ist allerdings zu beachten, dass sie aus einem hochkomplexen Multikomponentensystem abgeleitet werden. So kann nicht zweifelsfrei ausgeschlossen werden, dass beispielsweise eine ineffiziente Umsetzung eines Intermediats stromabwärts in der Sequenz einen Rückstau zur Folge haben kann. Falls die betreffenden Enzyme weiter stromaufwärts anfällig für Produktinhibierung sind, würde so eine Akkumulation von Intermediaten an Wegpunkten der Sequenz erfolgen, die eigentlich nicht durch eine reduzierte Substratflexibilität gegenüber den modifizierten Vorläufern gekennzeichnet sind. Von diesen Betrachtungen beeinflusst werden im Folgenden die bei den erhaltenen Mutaprodukten auftretenden Muster der post-PKS-Modifizierungen diskutiert (Schemata 21-22).

In keinem Fall der im Rahmen dieser Studien erzeugten Mutaprodukte wurde eine der bekannten Veränderungen der aromatischen Einheit festgestellt. In Übereinstimmung mit vorherigen Studien verlangt eine Chlorierung der Position 19 zunächst ein unsubstituiertes Phenol an Position 20, das nachfolgend *O*-methyliert werden kann.³⁵ Eine Methylierung durch *Asm7* scheint zudem nur an einer phenolischen Hydroxy-Funktion möglich zu sein, während bei den aus Benzylalkohol **37S** hervorgehenden Mutaprodukten **42** keine entsprechende *O*-Methylierung auftrat (Schema 22).

Die auf Dekorationen der arylischen Untereinheit folgende Modifizierung betrifft die östliche Hemisphäre des (Pro-)Ansamitocin-Grundgerüsts an einer Stelle, die so weit wie möglich von den mutasynthetisch eingeführten Substituenten entfernt ist. Folglich wäre zu erwarten, dass eine 7-*O*-Carbamoylierung der intermediär gebildeten Proansamitocin-Derivate unbeeinflusst von der unnatürlich dekorierten, westlichen Hemisphäre des Grundgerüsts erfolgen kann. In der Tat dominierten Derivate mit 7-*O*-Carbinolamid-Einheit das Spektrum der auftretenden Mutaprodukte. Im Fall der 20-Chloransamitocine **39** erwies sich das ausschließlich carbamoylierte Derivat **39b** sogar als Hauptprodukt der Fermentation, während der korrespondierende Proansamitocin-Vorläufer **39a** nur in Spuren massenspektrometrisch detektiert werden konnte (Schema 21).



Schema 21: Mutasynthetisch erzeugte 20-Chlor- (**39**), 20-Iod- (**40**) und 20-Cyanoansamitocin-Derivate (**41**) im Kontext eines Vorschlags zu ihrer Biosynthesesequenz. Angaben für Fermentationsausbeuten entsprechen

(Fortsetzung) isolierten und vollständig charakterisierten Verbindungen. Gestrichelte Pfeile geben Transformationen mit alternativen und unbelegten Schrittfolgen an. Mutasynton **21S** wurde als Hydrochlorid verfüttert.

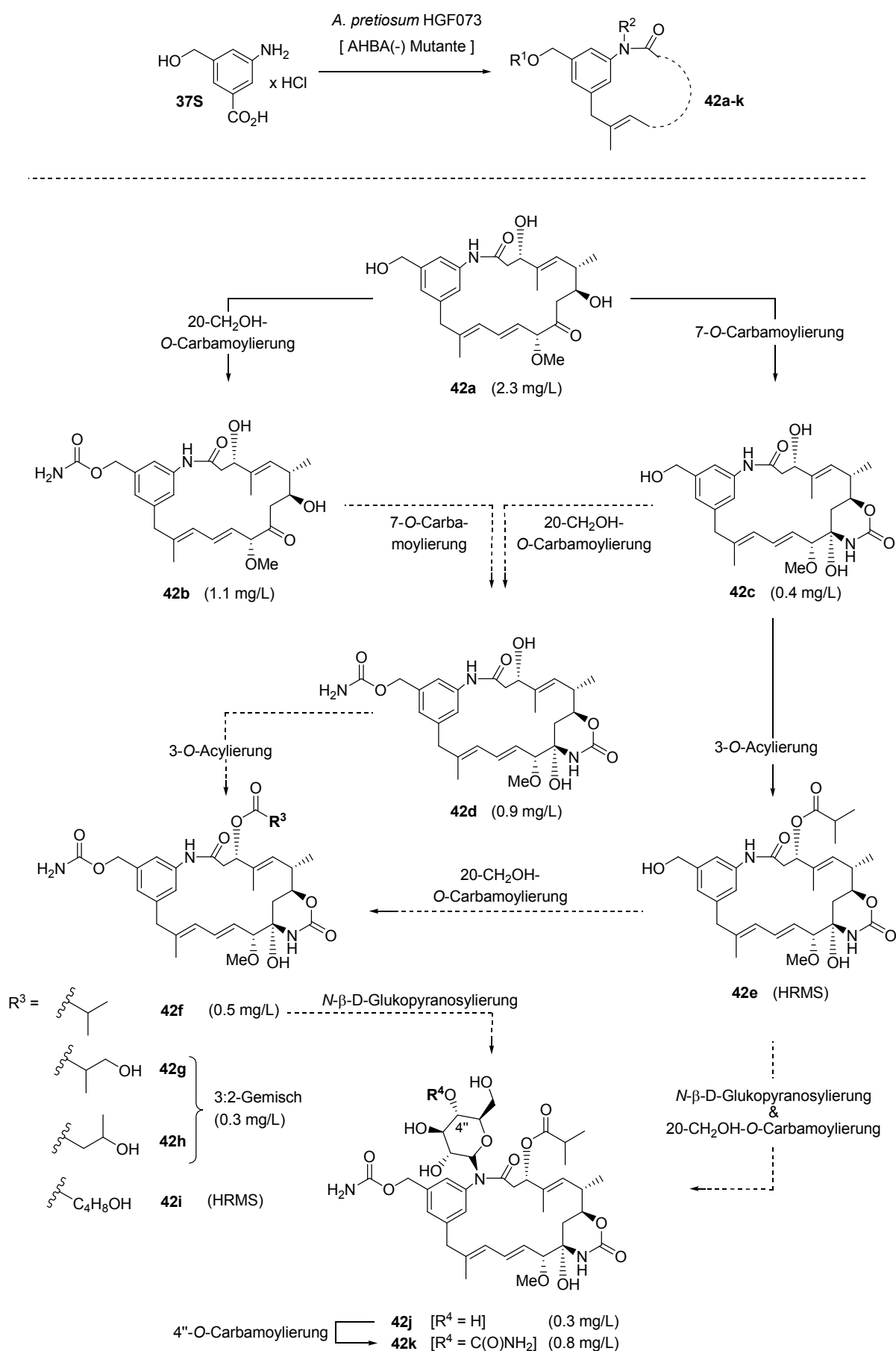
Durch die vollständige NMR-Charakterisierung der Verbindung **39b** existieren erstmals verlässliche Vergleichsdaten für Derivate dieser Modifizierungsstufe. In Studien von MOSS *et al.* erwies sich das natürliche, mit raumfüllendem 19-Chlor-20-*O*-Methyl-Substitutionsmuster dekorierte Carbamoylproansamitocin-Derivat als konformativ so instabil, dass bei der Aufnahme von NMR-Spektren starke Linienverbreiterung und geringe Signalintensitäten auftraten.⁷⁹ Dies konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestätigt werden (Kapitel 4.1.5), wobei hier auf Basis der scharfen Signale des Spektrensatzes von Mutaprodukt **39b** eine eindeutigere Zuweisung der in der östlichen Hemisphäre situierten Nuklei zu entsprechenden Signalen erfolgen konnte.

Nach Fermentation der 3-Amino-5-chlorbenzoesäure **21S** konnten allerdings auch Produkte isoliert werden, denen die zu carbamoylierende Hydroxylfunktion an C-7 fehlte (**39f-h**). Dieser ungewöhnliche Produkttyp entspricht den nach Biotransformation mit *A. pretiosum* HGF073 aufgetretenen 7-Desoxyproansamitocin-Derivaten **15a/b**, die bereits in Kapitel 4.1.1 beschrieben und diskutiert wurden. Demnach handelt es sich bei der auftretenden 7-Desoxygenierung um einen bisher unbekannten post-PKS-Schritt, der mechanistisch mit der Biosynthese von Desoxyzuckern vergleichbar ist (vgl. Kapitel 4.1.1).

Neben einem 7-desoxygenierten 20-Chlorproansamitocin **39f** wurden zudem Derivate erhalten, bei denen die Ketofunktion an C-9 zum Alkohol reduziert (**39g**), sowie zusätzlich carbamoyliert worden war (**39h**). Die Konfiguration der entstandenen Alkohole konnte aufgrund von Signalüberlagerungen (**39f**) und auf Basis der mangels Vergleichssubstanzen nicht eindeutigen Kopplungskonstanten (**39g**, $J_{(9-10)} = 7.2$ Hz) bisher nicht zugewiesen werden.⁸⁰ So kann keine zweifelsfreie Aussage erfolgen, ob Alkohol **39g** den Vorläufer von Verbindung **39h** darstellt, oder eine andere Konfiguration am C-9-Stereozentrum aufweist. Zudem ist fraglich, ob die bei Derivat **39h** aufgetretene Carbamoylierung auf die Aktivität der 7-*O*-Carbamoyltransferase *Asm21* zurückzuführen ist. Adäquate Antworten können hierbei nur durch *in vitro*-Studien mit dem isolierten Enzym gegeben werden.

⁷⁹ S. J. Moss, L. Bai, S. Toelzer, B. J. Carroll, T. Mahmud, T.-W. Yu, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6544-6545.

⁸⁰ Semisynthetische Arbeiten zur Erzeugung von Vergleichssubstanzen werden zur Zeit von SIMONE EICHNER durchgeführt.



Schema 22: Mutasynthetisch erzeugte 20-Hydroxymethylansamitocin-Derivate (**42**) im Kontext eines Vorschlags zu ihrer Biosynthesesequenz. Angaben für Fermentationsausbeuten entsprechen isolierten und

(Fortsetzung) vollständig charakterisierten Verbindungen. Gestrichelte Pfeile geben Transformationen mit alternativen und unbelegten Schrittfolgen an.

Im Gegensatz zu allen bisher beschriebenen Mutasyntesen mit *A. pretiosum* HGF073 lieferte nur die Fermentation mit Benzylalkohol **37S** das entsprechende Proansamitocin-Derivat **42a** als Hauptprodukt der Fermentation (Schema 22). Die Akkumulation dieses Vorläufers lässt auf eine ineffiziente Prozessierung durch die 7-*O*-Carbamoyltransferase schließen. Im Rahmen der Fermentationsaufarbeitung konnten allerdings mehrere Komponenten isoliert werden, deren massenspektrometrisch zugewiesene Summenformeln auf das Auftreten von verschiedenen einzelnen, sowie doppelten Carbamoylierungen schließen ließen. Nach einer aufwendigen Reinigungssequenz wurden die Verbindungen NMR-spektroskopisch in Methanol- d_4 charakterisiert. Während die 20-benzylischen Protonen der Derivate **42a** und **42c** Resonanzen bei 4.55 ppm ähnlich des Vorläufermutasynthons **37S** aufwiesen (4.73 ppm),⁷¹ erschienen diese Protonen für die weiteren isolierten Derivate tieffeldverschoben bei 5.00 ppm. Zudem zeigte sich für letztere Verbindungen bei ^1H - ^{13}C -Korrelationsexperimenten (HMBC) ein Kontakt der 20-benzylischen Protonen zu einem quartären Kohlenstoff bei 159.7 ppm. Diese Daten können eindeutig als Auftreten einer Carbamoylierung am mutasyntetisch eingeführten Benzylalkohol interpretiert werden. Neben Proansamitocin-Derivat **42a** dominierten Mutaprodukte mit benzylichem Carbinolamid das Spektrum der erhaltenen (Pro-)Ansamitocine. Dieser neue post-PKS-Modifizierungsschritt wird demnach scheinbar sehr effizient durchgeführt, wobei zu spekulieren wäre, ob diese Transformation auch auf die Aktivität der 7-*O*-Carbamoyltransferase *Asm21* zurückzuführen ist. Die geringen Ausbeuten für Verbindung **42c** deuten auf eine effiziente Umwandlung zu fortgeschrittenen Intermediaten hin, wobei die relativ hohen Ausbeuten für benzylich carbamoylierte Derivate **42b** und **42d** vermuten lassen, dass es sich hierbei möglicherweise um Endprodukte der post-PKS-Prozessierung handeln könnte. Dies würden allerdings nur *in vitro*-Experimente mit den entsprechenden post-PKS-Enzyme zeigen können.

Wie bereits von SPITELLER *et al.* beschrieben wurde,³³ stellt die 7-*O*-Carbamoylierung eine essenzielle Voraussetzung für die nachfolgende 3-*O*-Acylierung dar. In allen Mutaprodukt-Serien traten acylierte Derivate auf, die grundsätzlich auch das entsprechende Carbinolamid aufwiesen. Hierbei dominierte die durch L-Valin-Supplementierung dirigierte Isobuttersäure-Seitenkette (*vide supra*), wobei zusätzlich im Fall der Mutaprodukte **42g-i** Derivate mit bekannten hydroxylierten Seitenketten gefunden wurden.⁴⁷ Im Rahmen von MS/MS-Experimenten neigen 3-*O*-acylierte Ansamitocine besonders zur Eliminierung der Esterseitenkette, so dass durch die Massendifferenz eine Hydroxylierung eindeutig der

Seitenkette zugeordnet werden kann. Während ein Derivat mit hydroxylierter (Iso-)Valeriansäure-Seitenkette (P-4 Typ) **42i** nur massenspektrometrisch detektiert wurde, konnten entsprechende Iso- und n-Buttersäure-Seitenketten tragende Mutaprodukte **42g/h** als untrennbares Gemisch isoliert und charakterisiert werden. Die Konfigurationen der in den Seitenketten auftretenden Stereozentren ließen sich aufgrund dieser Daten allerdings nicht ermitteln.

Das Auftreten der am Makrolaktamamid *N*-methylierten und nicht 4,5-epoxidierten Derivate **39d**, **40c** und **41c** erweitert die publizierte Vorstellung zum Ablauf der post-PKS-Prozessierung (Schema 20). Insbesondere die vollständige Charakterisierung des isolierten Derivats **39d** belegt eindeutig, dass die *N*-Methylierung durch *Asm10* ohne vorherige Epoxidierung durch *Asm11* ablaufen kann, was entsprechend auch *vice versa* gilt.⁸¹ Wie bereits erwähnt basiert die von SPITELLER *et al.* publizierte Prozessierungssequenz auf Geninaktivierungsstudien.³³ Nach Inaktivierung der Epoxidase *Asm11* wurden in diesen Studien nur Produkte gefunden, denen sowohl die entsprechende Epoxidfunktion, als auch die *N*-Methylierung fehlte (vgl. **39c**). Dies legte nahe, dass nur 4,5-epoxidierte Intermediate einer nachfolgenden *N*-Methylierung unterzogen werden können. Der Grund für die nun zu revidierende Hypothese ist auf der genetischen Ebene zu vermuten. Da das Gen der Epoxidase *Asm11* direkt stromaufwärts vom Gen der Methyltransferase *Asm10* auf dem bakteriellen Chromosom liegt (Schema 20), kann die eingeführte Deletion im *asm11*-Gen durch polare Effekte die Expression beider Enzyme in der nötigen aktiven Form verhindert haben.

Mit einer Ausnahme konnten in allen Mutaprodukt-Serien vollständig prozessierte Derivate mit allen vier nicht-arylischen Dekorationen gefunden werden (**39e**, **40d** und **41d**). Weder *N*-Methylierung, noch Epoxidierung des 4,5-Alkens traten in dem aus Mutasynton **37S** hervorgehenden Mutaprodukt-Spektrum **42** auf, was auf einen störenden Einfluss des freien oder carbamoylierten 20-Benzylalkohols zurückgeführt werden kann. Allerdings konnten zwei polare Produkte mit hoher molekularer Masse isoliert und charakterisiert werden (**42j**, **42k**). Diesen Derivaten konnte eine *N*-β-D-Glukosylierung des Makrolaktam-Amids nachgewiesen werden. Dieser Modifizierungstyp wurde kürzlich bei Ansamitocin-Derivaten beschrieben, die nach Oberflächenkultur von *A. pretiosum* auf Agarsubstrat,⁸² sowie durch Fermentation eines ähnlichen Ansamitocin-Produzentenstamms

⁸¹ Siehe auch Kapitel 4.1.3.

⁸² a) J. Ma, P.-J. Zhao, Y.-M. Shen, *Arch. Pharm. Res.* **2007**, *30*, 670-673; b) C. Lu, L. Bai, Y. Shen, *J. Antibiot.* **2004**, *57*, 348-350.

gewonnen werden konnte.⁸³ Die NMR-spektroskopischen Daten für die Zuckereinheit der Derivate **42j** und **42k** zeigen gute Übereinstimmung mit den literaturbekannten Angaben. Die entsprechende *N*-Glukosyltransferase *Asm25* aus *A. pretiosum* wurde von ZHAO *et al.* kloniert, exprimiert und *in vitro* charakterisiert.⁸⁴ Im Rahmen dieser Studien wurde gezeigt, dass das Enzym UDP-Glukose als Glykosyldonor nutzt. Folglich ist zu postulieren, dass das Carbinolamid der Zuckereinheit von Derivat **42k** aus der Carbamoylierung von Verbindung **42j** resultiert. Eine mögliche Involvierung der 7-*O*-Carbamoyltransferase *Asm21* wäre durch zukünftige *in vitro*-Studien zu belegen. Bemerkenswert erscheint allerdings, dass die *N*-Glykosyltransferase *Asm25* im Gegensatz zur *N*-Methyltransferase *Asm10* nicht grundlegend durch die freien oder carbamoylierten Benzylalkohole der Zwischenstufen **42e/f** in ihrer Aktivität gestört wird.

4.1.2.4 Biologische Aktivitäten

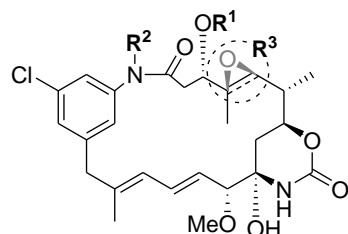
Die mutasynthetisch erzeugten Ansamitocin-Derivate wurden von FLORENZ SASSE am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung⁵⁴ auf ihre biologische Aktivität untersucht. Hierzu wurden erste Zytotoxizitätstests an L-929 Mausfibroblasten, sowie verschiedenen Krebszelllinien humanen Ursprungs durchgeführt. Als Referenz sind die im Rahmen der Arbeiten von FLORIAN TAFT³⁶ ermittelten Werte zur Aktivität des natürlichen AP-3 **1c** angegeben (Tabelle 2).⁵⁵ Insbesondere Derivat **39d** konnte eine Aktivität in der Größenordnung des „Goldstandards“ AP-3 **1c** nachgewiesen werden. Mit Ausnahme der Derivate **39c/e** und **42f** konnte entsprechend der einleitend diskutierten Struktur-Aktivitäts-Beziehungen bei keiner der weiteren dargestellten Verbindungen eine vergleichbare biologische Aktivität ermittelt werden. Die geringe biologische Aktivität der glukosylierten Ansamitocine **42j/k** steht in Übereinstimmung mit in der Literatur beschriebenen Daten zu den natürlichen Varianten dieses Typs.⁸²⁻⁸³

⁸³ C. E. Snipes, D. O. Duebelbeis, M. Olson, D. R. Hahn, W. H. Dent, III., J. R. Gilbert, T. L. Werk, G. E. Davis, R. Lee-Lu, P. R. Graupner, *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 1578-1581.

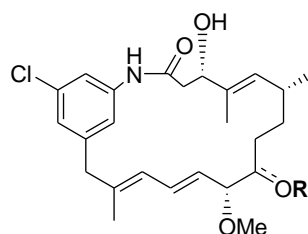
⁸⁴ P. Zhao, L. Bai, J. Ma, Y. Zeng, L. Li, Y. Zhang, C. Lu, H. Dai, Z. Wu, Y. Li, X. Wu, G. Chen, X. Hao, Y. Shen, Z. Deng, H. G. Floss, *Chemistry & Biology* **2008**, *15*, 863-874.

Tabelle 2: IC₅₀-Werte [nM] der Mutaproducte im Vergleich zum natürlichen Ansamitocin P-3 **1c**.

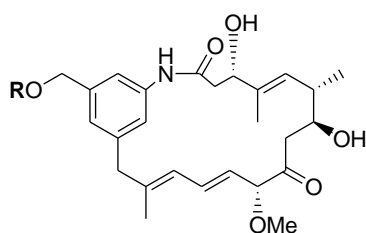
Zelllinien: L-929 (Mausfibroblasten), KB-3-1 (Gebärmutterhalskarzinom), U-937 (Leukämie), A-431 (Hautkarzinom), SK-OV-3 (Eierstockadenokarzinom), PC-3 (Prostataadenokarzinom), MCF-7 (Brustadenokarzinom), HUVEC (Nabelschnurendothelzellen).

Ansamitocin-Derivate:

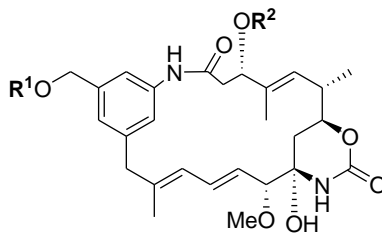
- 39b** [R¹ = H, R² = H, R³ = Alken]
39c [R¹ = C(O)CH(CH₃)₂, R² = H, R³ = Alken]
39d [R¹ = C(O)CH(CH₃)₂, R² = Me, R³ = Alken]
39e [R¹ = C(O)CH(CH₃)₂, R² = Me, R³ = Epoxid]



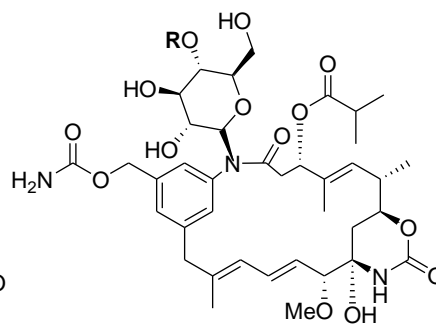
- 39f** [R = Keton]
39g [R = H]
39h [R = C(O)NH₂]



- 42a** [R = H]
42b [R = C(O)NH₂]



- 42c** [R¹ = H, R² = H]
42d [R¹ = C(O)NH₂, R² = H]
42f [R¹ = C(O)NH₂, R² = C(O)CH(CH₃)₂]



- 42j** [R = H]
42k [R = C(O)NH₂]

Zelllinie	AP-3	39b	39c	39d	39e	39f	39g	39h	42a	42b	42c	42d	42f	42j	42k
L-929	0.2	>80	8.7	0.54	3.14	>90	>90	> 800	>90	>80	>80	>70	>65	>500	>500
KB-3-1	0.17		0.56					>80							
U-937	0.01	149	0.05	0.05	0.18	1099	1004	>800	>900	>800	>800	>700	1.5	348	659
A-431	0.08	>80	1.6	0.1	0.35	>90	>90	>80	>90	>80	>80	>70	8.5	>500	>500
SK-OV-3	0.05	>800	0.66	0.05	0.21	>900	>900	>80	>900	>800	>800	>700	6.8	>500	452
PC-3	0.06	>800	0.3	0.16	0.53	>900	>900	>80	>900	>800	>800	>700	14.0	>500	>500
MCF-7		>800	0.9	0.11	0.41	>900	>900	>80	>900	>800	>800	>700	12.4	>500	>500
HUVEC	0.02	>800	0.32	0.08	0.21	>900	>900		>900	>800	>800	>700	6.7	>500	>500

4.1.3 Mutasyntesen unter Esterseitenkettendirektierung

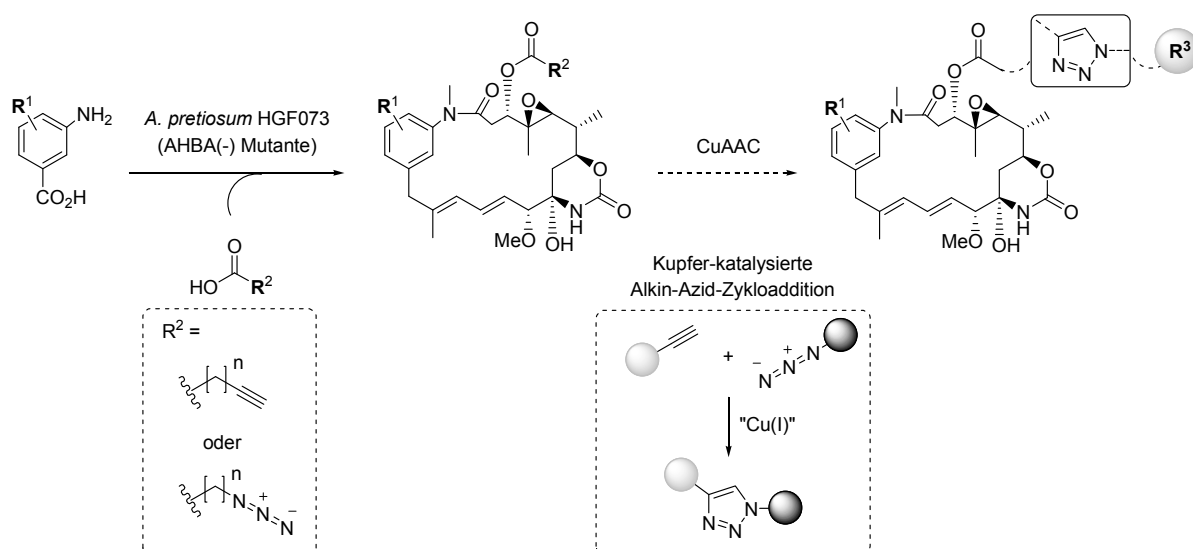
Im vorherigen Kapitel wurden mutasynthetische Ansätze zu neuen Ansamitocin-Derivaten mit veränderter aromatischer Untereinheit vorgestellt, die aus dem Einbau von unnatürlichen Analoga der PKS-Startereinheit AHBA **6** hervorgingen. Ein weiteres durch Vorläufer-dirigierte Biosynthese adressierbares Strukturelement stellt die Esterseitenkette der Ansamitocine dar.

4.1.3.1 Eingehende Betrachtungen

Frühe Experimente zur Beeinflussung des natürlich auftretenden Komponentenspektrums in den Seitenketten divergierender Ansamitocin-Derivate wurden von HATANO *et al.* beschrieben, wobei sowohl strukturverwandte Carbonsäuren, Aldehyde, Alkohole oder Aminosäure-Verläufer genutzt werden konnten.³⁸ Insbesondere in Hinsicht auf die einleitend beschriebene Nutzung der Esterseitenkette zur Anbindung von Tumor-gerichteten Komponenten bei Verbindungen des Maytansin-Typs erscheint eine Vorläufer-dirigierte Biosynthese mit unnatürlichen Acylseitenketten-Vorläufern als interessant. Falls die neu eingeführten Strukturelemente im Nachhinein für eine selektive chemische Derivatisierung genutzt werden könnten, bestünde so in Kombination mit dem in Kapitel 4.1.2 beschriebenen Mutasyntesen ein fermentativer Zugang zu Ansamitocin-Derivaten, die direkt für den Aufbau von Tumor-gerichteten Konjugaten genutzt werden könnten (Schema 23).

Als geeignete Seitenkettenvorläufer würden sich hierbei kurzkettige Carbonsäuren mit terminalen Azido- und Alkynyl-Substituenten erweisen. Diese könnten sich als kompatibel mit dem bekannten Substratspektrum der betreffenden Acyltransferase *Asm19* zeigen (vgl. Schema 24) und wären in chemischer Hinsicht durch ihre geringe Reaktivität auch mit dem biologischen System vereinbar. Die resultierenden Ansamitocin-Derivate würden sich zudem für den hochselektiven Aufbau von Konjugaten beispielsweise durch Kupfer-katalysierte Alkin-Azid-Zykloaddition (CuAAC) eignen (siehe Kapitel 4.1.6).⁸⁵

⁸⁵ Einen umfassenden Überblick gibt: J. E. Hein, V. V. Fokin, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 1302-1315.



Schema 23: Konzept einer kombinierten Mutasynthese mit AHBA-Derivaten und Vorläufer-dirigierter Biosynthese mit Alkin- und Azidocarbonsäuren zur Darstellung von durch Kupfer-katalysierte Alkin-Azid-Zykloaddition (CuAAC) chemisch derivatisierbaren Ansamitocin-Derivaten.

Allerdings ist zu beachten, dass die xenobiotischen Substanzen auch anderen Stoffwechselprozessen unterliegen können. So würden die unnatürlichen Carbonsäuren nach interner Aktivierung als Coenzym A-Thioester (Schema 24) nicht nur in die Ansamitocin-Biosynthese einfließen können, sondern beispielsweise auch den β -Oxidationsprozessen des Fettsäurestoffwechsels unterliegen. In der Tat wird Alkynyl-substituierten Carbonsäuren im Rahmen dieses Abbaus in der Literatur eine generelle Toxizität gegenüber lebenden Organismen zugeschrieben.⁸⁶ In der Literatur ist nur ein Beispiel zur Mutasynthese mit einer vergleichbaren Alkincarbonsäure bekannt, wobei das entstandene Produkt nur massenspektrometrisch charakterisiert wurde.⁸⁷ Alkine sind allerdings nicht prinzipiell unnatürlich, sondern kommen in oftmals labilen Naturstoffen in interner Position vor,⁸⁸ während terminale Alkine eher die Ausnahme bilden.⁸⁹ Im Gegensatz hierzu sind keine Naturstoffe mit Azido-Substituenten bekannt, wobei zudem einigen organischen Aziden eine mutagene Wirkung nachgewiesen wurde.⁹⁰

⁸⁶ C. Thorpe, *Trends Biochem. Sci.* **1989**, *14*, 148-151; 4-Pentinsäure als Inhibitor der β -Oxidation:

a) Y. Yoshizawa, Z. Li, P. B. Reese, J. C. Vederas, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 3212-3213; b) D. E. Cane, G. Luo, C. Khosla, C. M. Kao, L. Katz, *J. Antibiot.* **1995**, *48*, 647-651.

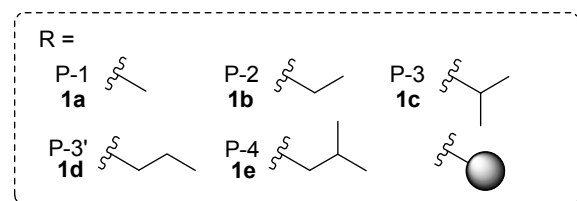
⁸⁷ 2-Methyl-pent-4-insäure; C. J. Dutton, S. P. Gibson, A. C. Goudie, K. S. Holdom, M. S. Pacey, J. C. Ruddock, J. D. Bu'Lock, M. K. Richards, *J. Antibiot.* **1991**, *44*, 357-365.

⁸⁸ Einen umfassenden Überblick gibt: R. E. Minto, B. J. Blacklock, *Prog. Lipid Res.* **2008**, *47*, 233-306.

⁸⁹ Ein terminales Alkin tritt bei Jamaicamiden auf: D. J. Edwards, B. L. Marquez, L. M. Nogle, K. McPhail, D. E. Goeger, M. A. Roberts, W. H. Gerwick, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 817-833.

⁹⁰ a) Y. Matsumura, T. Shiozawa, H. Matsushita, Y. Terao, *Biol. Pharm. Bull.* **1995**, *18*, 1805-1807; b) M. A. A. Sarhan, *J. Appl. Sci. Res.* **2007**, *3*, 886-889.

Schema 24).⁹¹



Transferasen (modifiziert nach MASSEY *et al.* und HEIDER).^{92,93}

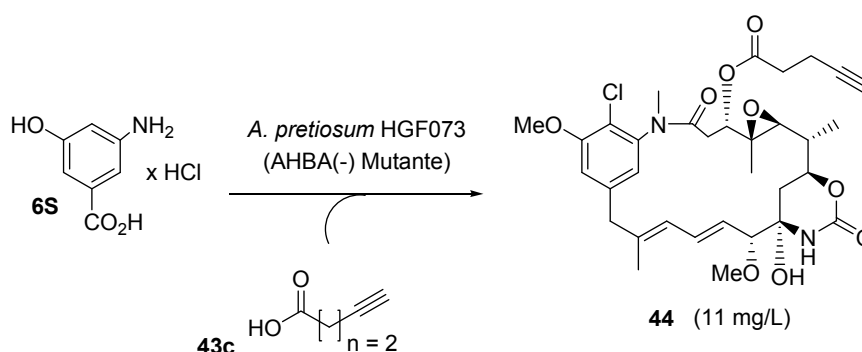
⁹² Katabolismus verzweigtkettiger Aminosäuren in Bakterien: L. K. Massey, J. R. Sokatch, R. S. Conrad, *Bacteriol. Rev.* **1976**, *40*, 42-54.

⁹³ Eine Übersicht zu CoA-Transferasen gibt: J. Heider, *FEBS Lett.* **2001**, 509, 345-349.

Die Konkurrenz mit den primärmetabolisch essenziellen unverzweigten Coenzym A-Thioestern wie Acetyl-, Propionyl- oder Butyryl-SCoA kann allerdings nicht durch inaktivierende Mutationen verhindert werden. Insbesondere das aus der Nutzung von Propionyl-SCoA resultierende Ansamitocin P-2 **1b** stellt neben den Ansamitocinen P-3 **1c** und P-4 **1e** eine Hauptkomponente der Fermentation von *A. pretiosum* dar.³⁸

4.1.3.2 Ergebnisse der Mutasynteseversuche

In Kapitel 4.1.2 wurde der Zusatz von L-Valin zur Dirigierung der Isobuttersäure-Seitenkette verwendet (Schema 24). Folglich wurde in ersten Experimenten zur Seitenketten-Dirigierung mit Acyl-Vorläufern auf dieses Additiv verzichtet. In einem initialen Experiment wurde AHBA*HCl **6S** (1.25 mmol/L) und 4-Pentinsäure (**43c**) (12.5 mmol/L) zu einer Kultur von *A. pretiosum* HGF073 im 55 mL Fermentationsmaßstab mittels des in Kapitel 4.1.2 beschriebenen Spritzenpumpensystems verfüttert (Schema 25).



Schema 25: Erstes Experiment zur Mutasyntese mit AHBA*HCl **6S** (1.25 mmol/L) unter paralleler Supplementation von 4-Pentinsäure (**43c**) (12.5 mmol/L). Die Angabe für Derivat **44** bezieht sich auf die isolierte Ausbeute.

Nach massenspektrometrischer Untersuchung konnte ein Einbau von 4-Pentinsäure (**43c**) festgestellt werden. Die Isolierung des Ansamitocin-Derivats **44** gelang in einer Fermentationsausbeute von 11 mg/L, wobei aus dem Integral des entsprechenden Signals im Rahmen der *reversed phase*-HPLC-Reinigung ein Anteil des Zielprodukts von ~19 % am Esterseitenkettenpektrum geschätzt werden konnte.

In Folgeexperimenten konnte die Ausbeute des ersten Experiments in mehreren Fermentationsläufen nicht reproduziert werden, wobei grundsätzlich nur geringe Gesamt-

Ansamitocin-Titer ($\ll 12$ mg/L) erreicht wurden.⁹⁴ Allerdings lieferten auch Referenzkulturen ohne Säure- und L-Valinzusatz nur Spuren Mengen an Ansamitocinen, während solche unter L-Valin-Supplementation Titer von mehr als 60 mg/L AP-3 **1c** erreichten.⁹⁵

Diese Ergebnisse zeigten, dass L-Valin in einer Konzentration von 3 g/L nicht nur den Einbau der Esterseitenkette dirigiert, sondern generell die Bereitschaft zur Ansamitocin-Produktion von *A. pretiosum* gewährleistet. Im Allgemeinen kann die L-Valin-Supplementation als Stressfaktor betrachtet werden, wobei über die zugrundeliegenden Mechanismen zu spekulieren wäre. Hierbei könnte beispielsweise eine „Feedback“-Inhibierung der Biosynthese verwandter Aminosäuren⁹² oder eine Beeinflussung des Anteils an verzweigten Membranlipiden über Isobutyryl-SCoA⁹⁶ eine Rolle spielen.

Um weitere Optimierungen für eine fermentative Darstellung der Vorläufer-dirigierten Biosynthese mit Carbonsäuren durchführen zu können, wäre zunächst ein Ersatz für das Stimulanz L-Valin zu finden, das zwar produktionsstimulierend wirkt, jedoch nicht zu einer Dominanz bestimmter Acylseitenkettenvorläufer führt. Im Folgenden werden Studien beschrieben, in deren Rahmen zunächst ohne Carbonsäure-Verfütterung der Effekt verschiedener Additive auf die Produktivität von *A. pretiosum* unter AHBA-Supplementierung betrachtet wurde (Schema 26). Um möglichst eine direkte Aussage über die Produktivität der Kulturen zu einem bestimmten Zeitpunkt erhalten zu können, wurde ein Vorläufer- und Zeit-limitiertes Szenario gewählt. Die Zugabe der essenziellen Startereinheit erfolgte hierbei in einer Portion (0.42 mmol/L) nach drei Tagen der Vorkultivierung mit den entsprechenden Additiven. Nach zwei weiteren Tagen der Kultivierung wurden daraufhin die Überstände der Fermentation einer HPLC-Analytik unterzogen (vgl. Abbildung 16). Es war zu erwarten, dass Kulturen unter dem Einfluss produktivitätsstimulierender Additive innerhalb von 48 Stunden einen höheren Anteil der zugegebenen Startereinheit AHBA **6S** zu Ansamitocinen⁹⁷ umsetzen würden als vergleichbare Referenzkulturen. Allerdings ist darauf hinzuweisen, dass die Kolben-zu-Kolben-Variation der Ansamitocin-Produktion bei den gewählten Kulturgrößen von 45 mL innerhalb eines Fermentationslaufs zwar exemplarisch als

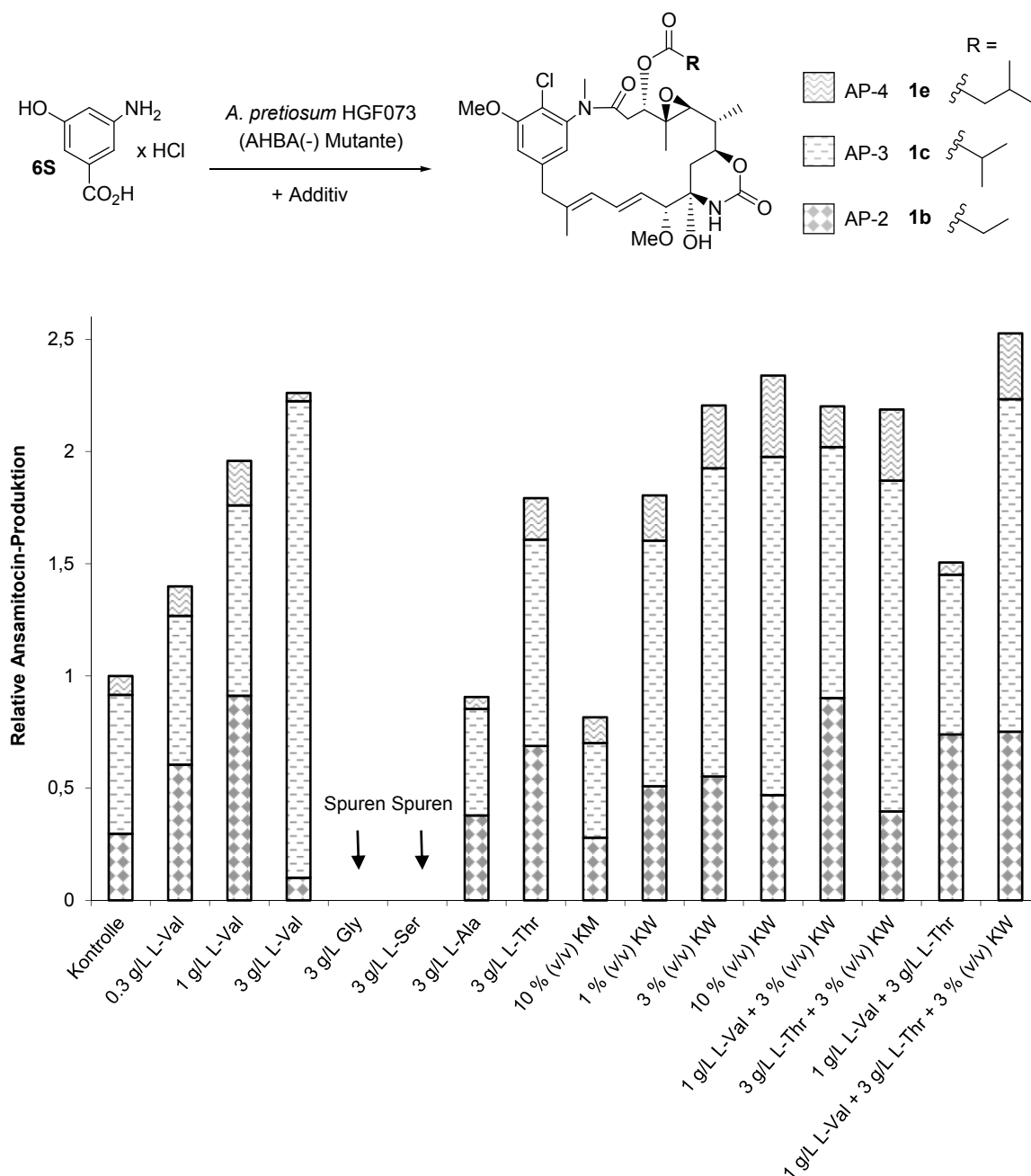
⁹⁴ Geschätzt durch analytische *reversed phase*-HPLC.

⁹⁵ Isolierte Ausbeute durch F. TAFT.³⁶

⁹⁶ Beispiel für *Streptomyces* sp.: A. Vančura, T. Řezanka, J. Maršálek, I. Vančurová, V. Křišťan, G. Basařová, *FEMS Microbiol. Lett.* **1987**, 48, 357-360; Beispiel für *Staphylococcus* spp.: P. T. Olesen, L. H. Stahnke, *Food Microbiol.*, **2003**, 20, 621-629.

⁹⁷ Betrachtet wurden AP-2, AP-3 und AP-4. Die Quantifizierung erfolgte über einen AP-3-Standard, s. Experimenteller Teil.

weniger als 10 % ermittelt wurde,⁹⁸ aber die Ansamitocin-Produktion verschiedener Läufe stärker schwanken kann.



Schema 26: Ergebnisse zu Optimierungsstudien der Produktivität und Esterseitenketteninkorporation von *A. pretiosum* HGF073 unter Verwendung verschiedener Additive. Gesamtansamitocin-Produktion der Kontrollen (n = 3): 36 ± 7 mg/L; Abkürzungen: Glycin, L-Valin, L-Serin, L-Alanin, L-Threonin; Kokosnusswasser = KW; Kokosnussmilch = KM.

⁹⁸ n = 8, Variationskoeffizient = 7.6 %; Kulturen mit durchschnittlicher, durch analytische reversed phase-HPLC geschätzter Gesamtansamitocinproduktion von 118 mg/L, s. Experimenteller Teil.

Die Verwendung der Aminosäuren Glycin und L-Serin als Medienzusätze in Konzentrationen von 3 g/L führte zu einer Inhibierung der Ansamitocin-Produktion, so dass nur Spuren massenspektrometrisch detektiert werden konnten. Unter Zusatz von L-Alanin (3 g/L) fand zwar eine Ansamitocin-Produktion statt, jedoch nur im vergleichbaren Maß zur Referenzkultur ohne zusätzlichen Stimulus. Sowohl durch Zusatz von L-Threonin (3 g/L), als auch von L-Valin in einer Konzentration von 1 g/L konnte eine Produktionssteigerung von über 75 % erreicht werden, wobei zudem keine Dominanz eines Esterseitenkettentyps auftrat. Kulturen mit Zusatz von L-Valin in der üblichen Konzentration von 3 g/L wiesen eine deutlichere Produktionssteigerung auf, die allerdings von der Prävalenz (>94 %) des mit einer Isobuttersäure-Seitenkette ausgestatten Ansamitocin P-3 **1c** begleitet wurde. Neben diesen definierten Zusätzen wurde auch Kokosnusswasser als komplexes Additiv in Betracht gezogen. Dieser flüssige Anteil des Kokosnussendosperms findet seit seiner Einführung durch VAN OVERBEEK *et al.* im Jahr 1941 breite Anwendung als Additiv in der Pflanzenzellkultur.^{99,100a} Insbesondere in Hinblick auf die einleitend beschriebene, vermutete Kooperation von bakteriellen Produzentenstämmen mit Pflanzen bei der Maytansin-Biosynthese erschien eine Untersuchung dieses Additivs sinnvoll. Hierfür wurde das steril filtrierte Kokosnusswasser einer reifen Kokosnuss in einem Anteil von 1-10 % (v/v) zu entsprechenden Kulturen supplementiert. Dieser Zusatz erwies sich als äußerst effektives Stimulanz, während die Verwendung von Dosenkokosmilch als Additiv hingegen nicht zu einer Steigerung der Ansamitocin-Produktion führte. In Folgeexperimenten zeigten sich allerdings Reproduktionsprobleme bei der Verwendung anderer Kokosnusswasser-Chargen von reifen Kokosnüssen, so dass Kokosnusswasser aus jungen Kokosnüssen verwendet wurde, das nach Sterilfiltration bei -80 °C gelagert wurde. Junge Kokosnüsse enthalten nicht nur deutlich mehr Kokosnusswasser, sondern unterscheiden sich auch deutlich in der Quantität der Inhaltsstoffe.¹⁰⁰ Zwar stimulierte die Verwendung von 10 % (v/v) des Additivs im Vergleich zu 3.3 % (v/v) die Biomasseproduktion auf mehr als das doppelte,¹⁰¹ führte aber zur Einstellung der Ansamitocin-Produktion. Aus diesem Grund wurde Kokosnusswasser aus jungen Kokosnüssen in Folgeversuchen grundsätzlich in einem Anteil von 3.3 % (v/v) eingesetzt (*vide infra*), wobei der stimulierende Effekt auch bei Verwendung verschiedener Chargen erhalten blieb.

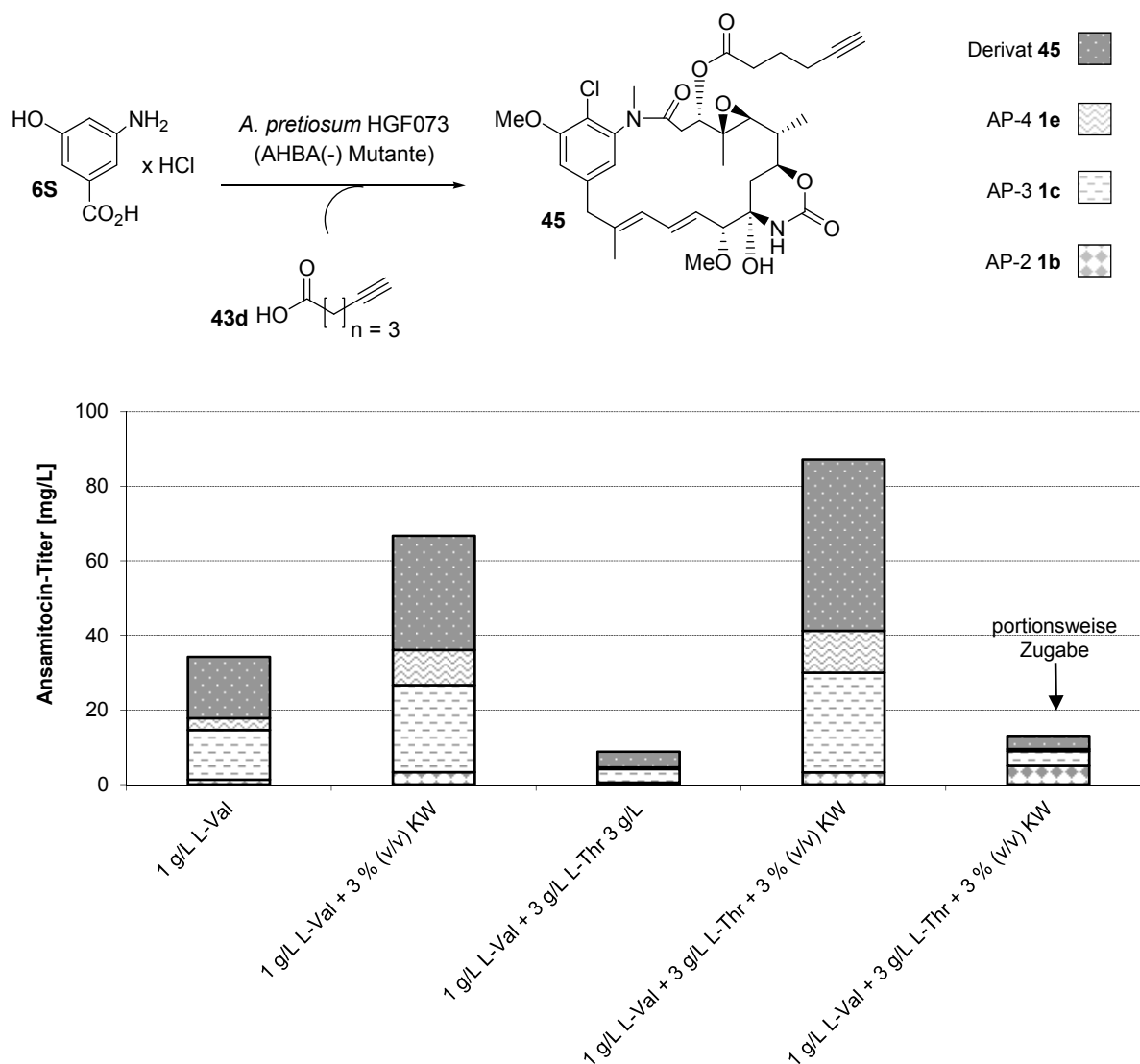
⁹⁹ J. van Overbeek, M. E. Conklin, A. F. Blakeslee, *Science* **1941**, *94*, 350-351.

¹⁰⁰ a) J. W. H. Yong, L. Ge, Y. F. Ng, S. N. Tan, *Molecules* **2009**, *14*, 5144-5164; b) Z. Ma, L. Ge, A. S. Y. Lee, J. W. H. Yong, S. N. Tan, E. S. Ong, *Anal. Chim. Acta* **2008**, *610*, 274-281.

¹⁰¹ 12 g Feuchtbiomasse aus 45 mL Fermentationsvolumen im Gegensatz zu 5 g (nach 3.5 Tagen der Inkubation von Hauptkulturen).

Weiterhin wurden Kombinationen des Kokosnusswasser-Additivs mit den Aminosäure-Stimulanzen L-Valin (1 g/L) und L-Threonin (3 g/L) betrachtet. Hierbei erwies sich insbesondere die Mischung aus allen drei Komponenten mit einer Produktionssteigerung um 150 % als vielversprechend für Versuche zur Vorläufer-dirigierten Biosynthese mit unnatürlichen Carbonsäuren.

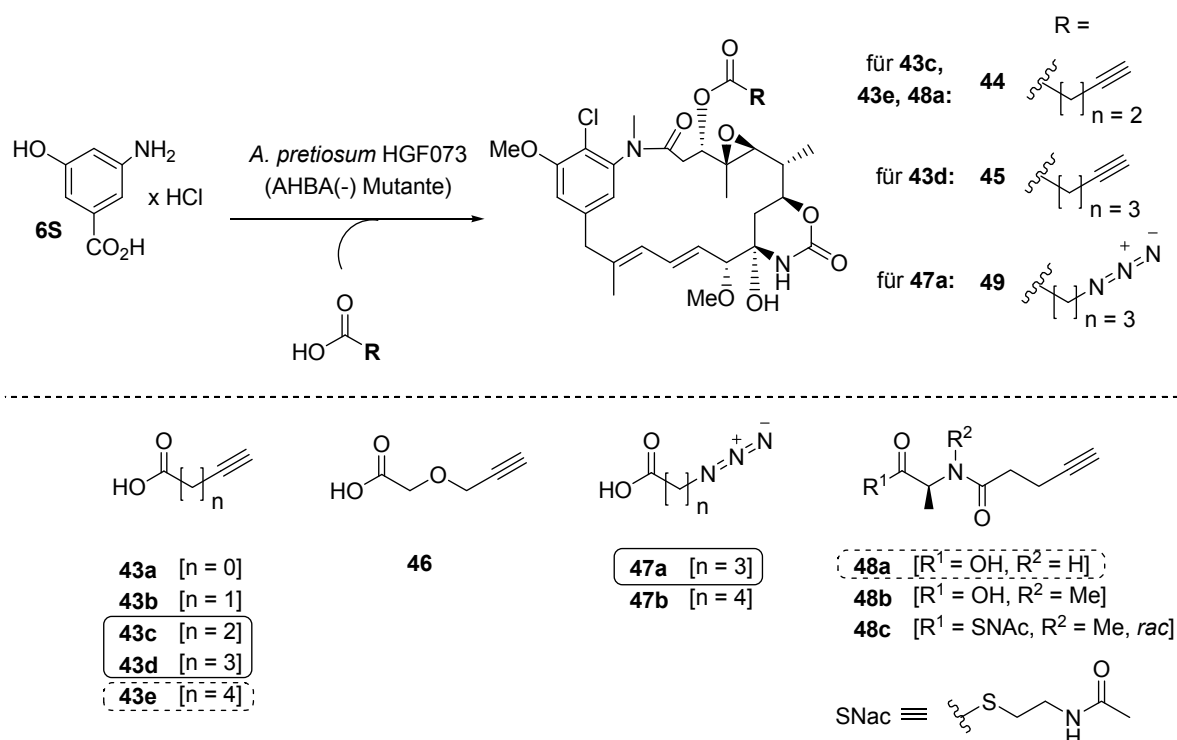
Wie exemplarisch an der Verfütterung der ebenfalls akzeptierten 5-Hexinsäure (**43d**) dargestellt wird, konnte Kokosnusswasser als wichtigste Komponente für diese Fermentationen identifiziert werden (Schema 27).



Schema 27: Ergebnisse zum Einfluss von Additiven auf die Ansamitocinproduktion und das Produktspektrum im Rahmen der Mutasynthese mit AHBA*HCl **6S** (1.25 mmol/L) unter paralleler Supplementation von 5-Hexinsäure (**43d**) (12.5 mmol/L) in kontinuierlicher Weise (via Spritzenpumpenzufütterung) oder in drei Portionen mit 24 Stunden-Intervall. Abkürzungen: L-Valin, L-Threonin; Kokosnusswasser = KW.

Allerdings zeigte sich das in Kapitel 4.1.2 beschriebene System der Spritzenpumpenverfütterung zudem als ebenso essenziell, da eine portionsweise Supplementation der Säuren zu einem deutlichen Einbruch der Ansamitocin-Produktion führte. Weiterhin wurde üblicherweise eine Neutralisierung der zugefütterten Säurelösung vorgezogen, da so einerseits der unangenehme Geruch bestimmter Carbonsäuren unterbunden wird, andererseits um bis zu 20 % höhere Produkttitel beobachtet wurden.

Unter den optimierten Bedingungen wurde die Akzeptanz der in Schema 28 dargestellten Carbonsäuren untersucht.



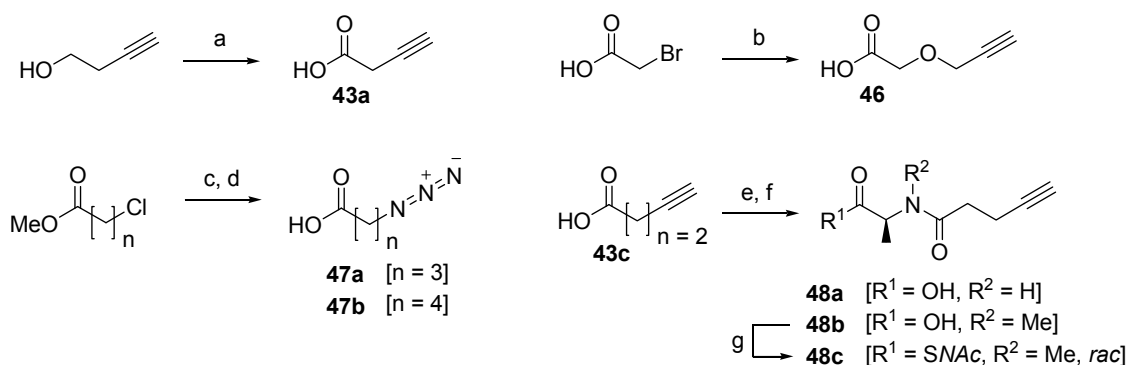
Schema 28: Als Acylseitenkettenvorläufer untersuchte Carbonsäuren und Derivate. Für Carbonsäuren **43c**, **43d** und **47a** konnte ein Einbau in Ansamitocin-Derivate festgestellt werden. Die Fermentation der Carbonsäuren **43e** und **48a** resultierte in der Bildung von Derivat **44**.

3-Butinsäure (**43b**) wurde hierfür oxidativ aus dem entsprechenden Alkohol erzeugt (Schema 29).¹⁰² Die Darstellung der Ether-haltigen Carbonsäure **46** erfolgte aus Bromessigsäure und Propargylalkohol,¹⁰³ während die Synthese der Azidocarbonsäuren **47a/b** aus den entsprechenden halogenierten Carbonsäuremethylestern durch Substitution mit Natriumazid und anschließender Verseifung gelang. Die Darstellung der an maytansinoide Seitenketten

¹⁰² L. Schmieder-van de Vondervoort, S. Bouttemy, J. M. Padrón J. Le Bras, J. Muzart, P. L. Alsters, *Synlett* **2002**, 243-246.

¹⁰³ T. L. Gilchrist, R. C. Wasson, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1987**, 2517-2522.

erinnernden Carbonsäuren **48a/b** erfolgte nach dem durch WIDDISON *et al.* beschriebenen Verfahren unter Umsetzung eines Aktivesters der 4-Pentinsäure (**43c**) mit L-Alanin-Derivaten.¹⁶ Die freie Carbonsäure **48b** wurde zudem in den entsprechenden Thioester **48c** mit dem Coenzym A-Mimetikum *N*-Acetylcysteamin (HSNAc) überführt.



Schema 29: Synthese von Carbonsäuren und Derivaten. Bedingungen: a) NaIO₄, Na₂Cr₂O₇, HNO₃, H₂O, RT, 59 %; b) NaH, Propargylalkohol, THF, 0 °C → Δ, 37 %; c) NaN₃, NaI (kat.), DMF, 60 °C; d) NaOH, H₂O, RT, **47a**: 63 % über 2 Stufen, **47b**: 58 % über 2 Stufen; e) *N*-Hydroxysuccinimid, EDC·HCl, CH₂Cl₂, RT; f) für **48a**: L-Alanin, für **48b**: *N*-Methyl-L-alanin, NEt₃, DME:H₂O, RT, **48a**: 97 % über 2 Stufen, **48b**: 83 % über 2 Stufen; g) *N*-Acetylcysteamin, EDC·HCl, DMAP, CH₂Cl₂, RT, 62 %.

Es konnten keine aus dem Einbau von Propinsäure (**43a**) oder 3-Butinsäure (**43b**) hervorgehenden Produkte detektiert werden, wobei diese toxischen Vorläufer zu Einbrüchen der Ansamitocin-Produktion von mehr als 75 % führten. Wie bereits erwähnt, erwiesen sich die Vorläufer 4-Pentinsäure (**43c**) und 5-Hexinsäure (**43d**) hingegen als geeignete Alkincarbonsäuren für das anvisierte Vorhaben. Überraschenderweise wurde der mit Carbonsäure **43d** vergleichbare Ether **46** nicht akzeptiert. Während ebenfalls 6-Heptinsäure (**43e**) nicht eingebaut wurde, trat in der Fermentation das Derivat **44** mit 4-Pentinsäure-Esterseitenkette auf, was durch den Abbau der zugegeben Säure **43e** im Rahmen von β-Oxidationsprozessen zu erklären ist. Das gleiche Derivat **44** konnte ebenfalls massenspektrometrisch nach Verfütterung des Amids **48a** detektiert werden. Während das unsubstituierte Amid **48a** somit offenbar durch Amidasen gespalten wurde, trat dies bei der *N*-methylierten Variante **48b** nicht auf. Diese führte jedoch weder als freie Säure **48b**, noch als mit einem Coenzym A-Mimetikum aktivierten Thioester **48c** zu einem positiven Ergebnis. Dieses Resultat ist somit in Übereinstimmung mit der als Randnotiz in der Literatur erscheinenden Beobachtung, dass die Acyltransferase *Asm19* der Ansamitocin-Biosynthese in *A. pretiosum* scheinbar nicht zu einer Nutzung von Seitenkettenvorläufern des Maytansin-

Typs fähig ist.¹⁰⁴ Während auch die Verfütterung von 5-Azidovaleriansäure (**47b**) nicht zu neuen Ansamitocinen führte, gelang jedoch die Fermentation mit 4-Azidobuttersäure (**47a**). Abbildung 16 zeigt eine Auswahl typischer HPLC-Spuren dieser Verfütterungsstudien.

RP18-HPLC-UV $\lambda=248$ nm

Absorption [mV]

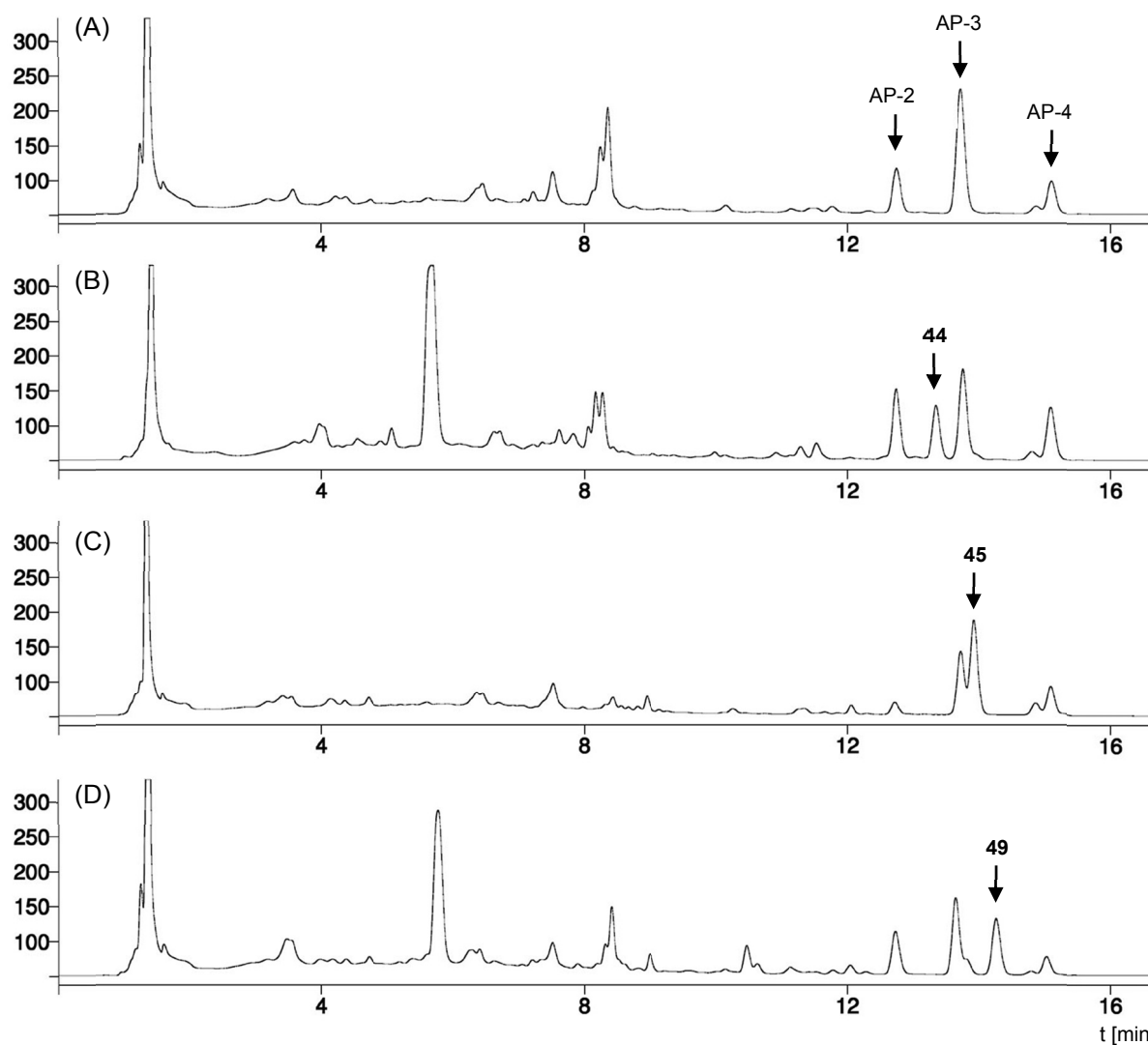


Abbildung 16: Typische *reversed phase*-HPLC-Chromatogramme der Kulturbrühen nach Fermentation von *A. pretiosum* HGF073 unter kontinuierlicher Supplementierung von AHBA*HCl **6S** (1.25 mmol/L) und Esterseitenkettenvorläufer (12.5 mmol/L). Additive: 1 g/L L-Valin, 3 g/L L-Threonin, 3.3 % (v/v) Kokosnusswasser. Bedingungen: (A) kein Säurezusatz; (B) 4-Pentinsäure (**43c**); (C) 5-Hexinsäure (**43d**); (D) 4-Azidobuttersäure (**47a**).¹⁰⁵

Der Anteil von mit den gewünschten Seitenketten ausgestatteten Ansamitocinen zeigte sich neben der Natur der Carbonsäure auch von einer Kombination der zugegebenen Menge sowie

¹⁰⁴ Unveröffentlichte Ergebnisse, Gruppe FLOSS; Erwähnt in: J. M. Cassady, K. K. Chan, H. G. Floss, E. Leistner, *Chem. Pharm. Bull.* **2004**, 52, 1-26.

¹⁰⁵ Bedingungen: Säule C18-A, Elutionsprogramm A; s. Experimenteller Teil.

der Produktivität des Produzentenstamms abhängig. Die anfänglich gewählte Menge von 12.5 mmol/L erwies sich als guter Kompromiss, wobei unter Verfütterung von 5-Hexinsäure (**43d**) typischerweise ein anteiliger Einbau von 50 % erreicht werden konnte, während 4-Pentinsäure (**43c**) und 4-Azidobuttersäure (**47a**) zu 19 % und 25 % verwendet wurden. Bei normaler Produktivität des Stamms (bis zu 80-110 mg/L) führte eine Verdoppelung der zugefütterten Carbonsäuremenge für 5-Hexinsäure (**43d**) üblicherweise nur zu einem geringen Anstieg des Anteils an gewünschtem Produkt (bis zu 7 %). Dies lässt sich als Sättigung des Stoffwechsels mit dem unnatürlichen Vorläufer interpretieren. Bei Fermentationsläufen mit herausragender Produktivität (>120 mg/L) konnte jedoch eine deutlichere Steigerung des Anteils der Zielverbindung **45** mit Erhöhung der hinzugegebenen Carbonsäuremenge erreicht werden (bis zu 24 %).

Insgesamt stellte sich die Vorläufer-dirigierte Fermentation mit den verwendeten Carbonsäuren als äußerst komplex dar. Neben der Additivmischung und der Verwendung des Spritzenpumpensystems erwies sich zudem die für die Optimierung bevorzugte Kulturgröße von 45 mL Fermentationsvolumen in 250 mL Erlenmeyerkolben als entscheidend für gute Ergebnisse. Eine für die Fermentation von *A. pretiosum*-Stämmen generell unproblematische Skalierung der Fermentation auf 120 mL Kulturvolumen in 500 mL Erlenmeyerkolben misslang. Bereits eine Erhöhung des Fermentationsvolumens auf 60 mL in 250 mL Erlenmeyerkolben hatte unter Verfütterung von 4-Azidobuttersäure (**47a**) einen Rückgang des gewünschten Zielprodukts **49** um 37 % zur Folge, während die Gesamtansamitocinproduktion zudem um 14 % einbrach.¹⁰⁶ Folglich erreichten die skalierten Kulturen nur 55 % des Zielprodukttiters im Vergleich zu den optimierten Standardbedingungen. Da unter den optimierten Bedingungen jedoch gute Ausbeuten erreicht werden konnten, wurde auf weitere Skalierungsstudien verzichtet.

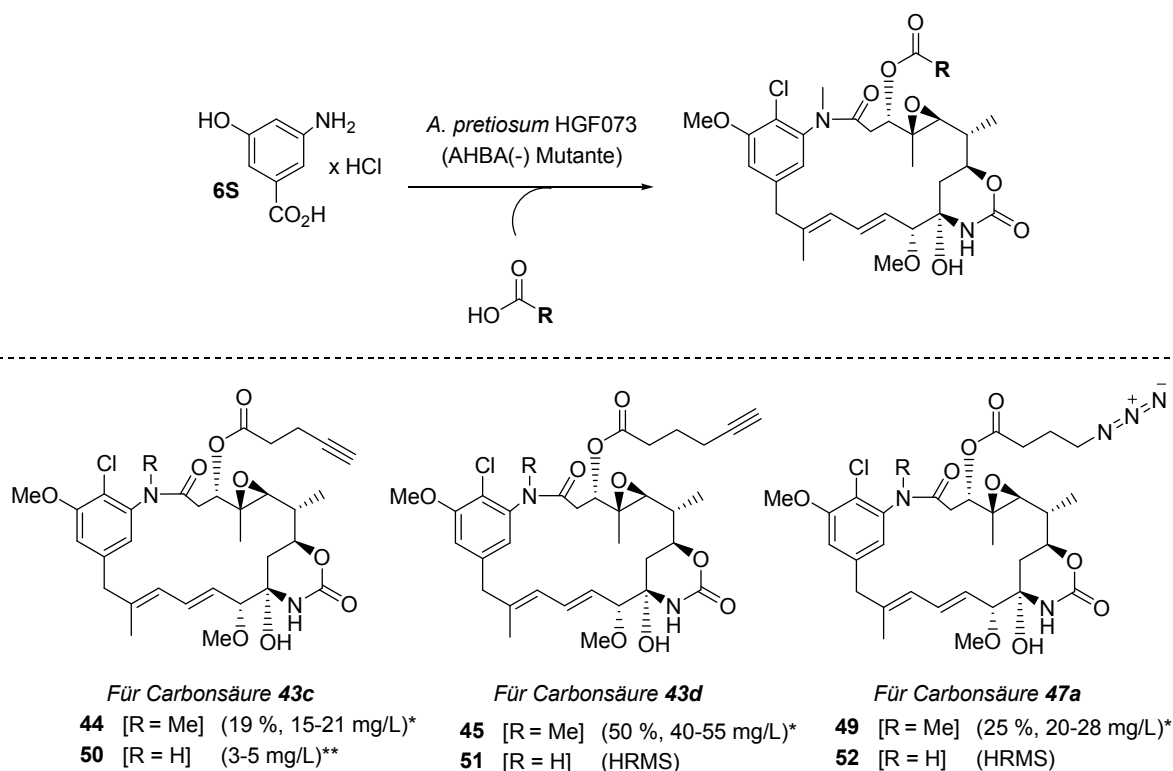
Aus den jeweiligen kombinierten Fermentationsbrühen der durchgeführten Optimierungsstudien konnten insgesamt 9.2 mg des Derivats **44**, sowie 28.0 mg von Ansamitocin **45** und 19.5 mg der Verbindung **49** isoliert werden. Die unter optimalen Bedingungen und durchschnittlicher Produktivität zu erwartenden Fermentationsausbeuten sind in Schema 30 dargestellt.

Generell erwiesen sich über Kalibrierung bestimmte Fermentationsausbeuten als verlässlich. So wichen die nach einer aufwendigen Reinigungssequenz isolierten Produktmengen für die

¹⁰⁶ Durchschnitt aus jeweils 4 Kulturen.

Derivate **45** und **49** nur um $\pm 10\text{--}15\%$ von den auf Basis der initialen HPLC-Analyse geschätzten Werten ab.¹⁰⁷

Während nicht *N*-methylierte Derivate **51** und **52** in den jeweiligen Kulturbrühen nur massenspektrometrisch detektiert werden konnten, wurde eine entsprechende Verbindung aus der Fermentation von 4-Pentinsäure (**43c**) in ausreichender Menge erhalten. Mit isolierten 2.6 mg trat die Verbindung **50** jedoch in etwa viermal geringerer Menge auf als das vollständig prozessierte Derivat **44**. Vermutlich behindert insbesondere die unnatürliche Pentinsäure-Esterseitenkette die Aktivität der *N*-Methyltransferase *Asm10*.



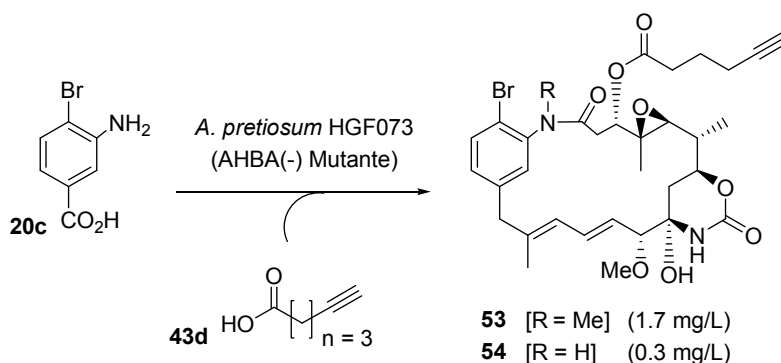
Schema 30: Durch kombinierte Mutasynthese und Vorläufer-dirigierte Biosynthese erzeugte Ansamitocin-Derivate (Carbonsäure: 12.5 mmol/L; Additive: 1 g/L L-Valin, 3 g/L L-Threonin, 3.3 % (v/v) Kokosnusswasser.) * Anteil am Ansamitocin-Spektrum und unter normaler Produktivität (80-110 mg/L) zu erwartende Fermentationsausbeuten ausgehend von Analysen der Fermentationsüberstände mittels analytischer *reversed phase*-HPLC mit UV-Detektion.⁹⁷ ** Geschätzt aus der Relation des isolierten Materials von Verbindung **50** zu Derivat **44**.

Da sich 5-Hexinsäure (**43d**) als effektivster Esterseitenkettenvorläufer präsentierte, wurde dieser für eine kombinierte Mutasynthese mit Bromaromat **20c** verwendet.¹⁰⁸ Hierbei gelang die Darstellung des Derivats **53** in einer Fermentationsausbeute von 1.7 mg/L, wobei zudem

¹⁰⁷ s. Experimenteller Teil.

¹⁰⁸ 3-Amino-4-brombenzoesäure (**20c**) wurde durch FLORIAN TAFT bereitgestellt.³⁶

auch ein entsprechendes *N*-Demethyl-Derivat **54** isoliert wurde. Die erzielte Ausbeute entspricht ~17 % des von FLORIAN TAFT ermittelten Werts im Rahmen einer Mutasynthese zum entsprechenden P-3-Derivat unter Standardbedingungen (3 g/L L-Valin).³⁶ In Anbetracht der hohen Komplexität des fermentativen Transformationsschritts ist dieses Ergebnis dennoch als Erfolg zu werten.



Schema 31: Kombinierte Mutasynthese und Vorläufer-dirigierte Biosynthese mit Bromaromat **20c** und 5-Hexinsäure (**43d**).

4.1.3.3 Biologische Aktivitäten

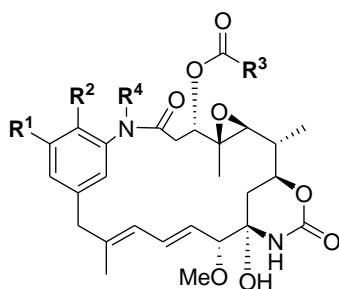
Die mutasynthetisch erzeugten Ansamitocin-Derivate wurden wie bereits in den vorherigen Kapiteln beschrieben von FLORENZ SASSE am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung⁵⁴ auf ihre biologische Aktivität untersucht (Tabelle 3).⁵⁵

Mit unnatürlichen Esterseitenketten ausgestattete Ansamitocin-Derivate **44**, **45**, **49** und **50** zeigten eine hohe biologische Aktivität ähnlich des natürlichen AP-3 **1c**. In analoger Weise konnten den aus dem Einbau von 5-Hexinsäure (**43d**) hervorgegangenen 19-Brom-20-demethoxy-Derivaten **53** und **54** eine zum entsprechenden, mit einer natürlichen P-3-Seitenkette versehenen Derivat **55** vergleichbare Aktivität nachgewiesen werden. In Übereinstimmung mit den einleitend unter Abschnitt 2.1 diskutierten Struktur-Aktivitäts-Beziehungen ergibt sich aus der An- oder Abwesenheit der *N*-Methylgruppe keine Änderung des zytotoxischen Potentials.

Tabelle 3: IC₅₀-Werte [nM] der Mutaprodukte im Vergleich zum natürlichen AP-3 **1c** und zum durch TAFT beschriebenen Mutaprodukt 19-Brom-20-demethoxy AP-3 **55**.³⁶

Zelllinien: L-929 (Mausfibroblasten), KB-3-1 (Gebärmutterhalskarzinom), U-937 (Leukämie), A-431 (Hautkarzinom), SK-OV-3 (Eierstockadenokarzinom), PC-3 (Prostataadenokarzinom), MCF-7 (Brustadenokarzinom), HUVEC (Nabelschnurendothelzellen).

Ansamitocin-Derivate:



- 44** [R¹ = OMe, R² = Cl, R³ = (CH₂)₂CCH, R⁴ = Me]
50 [R¹ = OMe, R² = Cl, R³ = (CH₂)₂CCH, R⁴ = H]
45 [R¹ = OMe, R² = Cl, R³ = (CH₂)₃CCH, R⁴ = Me]
49 [R¹ = OMe, R² = Cl, R³ = (CH₂)₃N₃, R⁴ = Me]
55 [R¹ = H, R² = Br, R³ = CH(CH₃)₂, R⁴ = Me]
53 [R¹ = H, R² = Br, R³ = (CH₂)₃CCH, R⁴ = Me]
54 [R¹ = H, R² = Br, R³ = (CH₂)₃CCH, R⁴ = H]

Zelllinie	AP-3	44	50	45	49	55	53	54
L-929	0.2	1.3	5.7	0.42	1.1	1.1	1.0	1.1
KB-3-1	0.17		0.11			0.46	0.04	0.05
U-937	0.01	0.03	0.11	0.02	0.08	0.05	0.04	0.05
A-431	0.08	0.16	0.2	0.08	0.12	0.15	0.1	0.1
SK-OV-3	0.05	0.1	0.35	0.05	0.07	0.08	0.09	0.17
PC-3	0.06	0.19	0.25	0.35	0.19	0.15	0.07	0.13
MCF-7	-	0.13	0.35	0.06	0.16		0.08	0.15
HUVEC	0.02	0.1	0.25	0.05	0.1	0.23	0.1	0.2

4.1.4 Studien zum Einfluss von Phytohormonen auf *A. pretiosum*

Der Zusatz von Kokosnusswasser hatte sich als essentiell für die beschriebenen Experimente erwiesen. Auf welche Inhaltsstoffe dieses komplexen Additivs ging der beobachtete Effekt zurück?

4.1.4.1 Eingehende Betrachtungen

Aus dem bekannten, hochkomplexen Inhaltsstoffspektrum von Kokosnusswasser sind vor allem die hohen Konzentrationen von Phytohormonen hervorzuheben, wobei insbesondere Indol-3-essigsäure (**56**, IAA) als dominierende Komponente auftritt (Schema 32).¹⁰⁰ Während diese Substanzen bekanntermaßen Wachstums-, Entwicklungs- und Reifungsprozesse bei Pflanzen beeinflussen und steuern,¹⁰⁹ werden sie nicht nur von den Pflanzen selbst, sondern auch von zahlreichen Mikroorganismen produziert.¹¹⁰ Beispielsweise konnten in verschiedenen Studien Actinomyceten-Stämmen des Genus *Streptomyces* bei Wachstum in L-Tryptophan-haltigen Medien eine Synthese von daraus abgeleiteten Auxin-artigen Substanzen wie IAA nachgewiesen werden.¹¹¹ Weiterhin war auch eine Beeinflussung der morphologischen Differenzierung von Streptomyceten bekannt. So hatten MATSUWAKA *et al.* eine Stimulierung der Luftmycelbildung und Sporulation bei 11 von 20 untersuchten *Streptomyces* spp.-Stämmen bei Kultivierung auf Agarmedium unter Zusatz von IAA in Konzentrationen von 1-20 mg/L beobachtet.¹¹² Unter diesen Bedingungen konnte eine verstärkte Produktion von antibakteriellen Substanzen beobachtet werden, während anhand eines Beispiels auch eine Verzehnfachung der Antibiotikaproduktion bei Kultivierung in Flüssigkulturen in Gegenwart von 20 mg/L (~0.1 mM) IAA nachgewiesen wurde.

Dem gegenüber steht die in Studien von HATANO *et al.* beschriebene Unterdrückung der Ansamitocin-Produktion unter L-Tryptophan-Zusatz bei *A. pretiosum*.³⁸ Zudem könnte aufgrund des der Literatur¹⁰⁰ entnommenen IAA-Gehalts von Kokosnusswasser von

¹⁰⁹ B. B. Buchanan, W. Gruissem, R. L. Jones, *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, Wiley & Sons **2002**.

¹¹⁰ Eine Übersicht gibt: a) E. A. Tsavkelova, S. Y. Klimova, T. A. Cherdynseva, A. I. Netrusov, *Appl. Biochem. Micro.* **2006**, 42, 117-126; Weitere Literatur: b) A. Karadeniz, Ş. F. Topcuoğlu, S. İnan, *World J. Microb. Biot.* **2006**, 22, 1061-1064; c) G. Assante, L. Merlini, G. Nasini, *Cell. Mol. Life Sci.* **1977**, 33, 1556-1557;

d) T. Tuomi, J. Ilvesoksa, S. Laakso, H. Rosenqvist, *J. Plant Growth Regul.* **1993**, 12, 149-156.

¹¹¹ a) S. Manulis, H. Shafir, E. Epstein, A. Lichter, I. Barash, *Microbiology* **1994**, 140, 1045-1050;

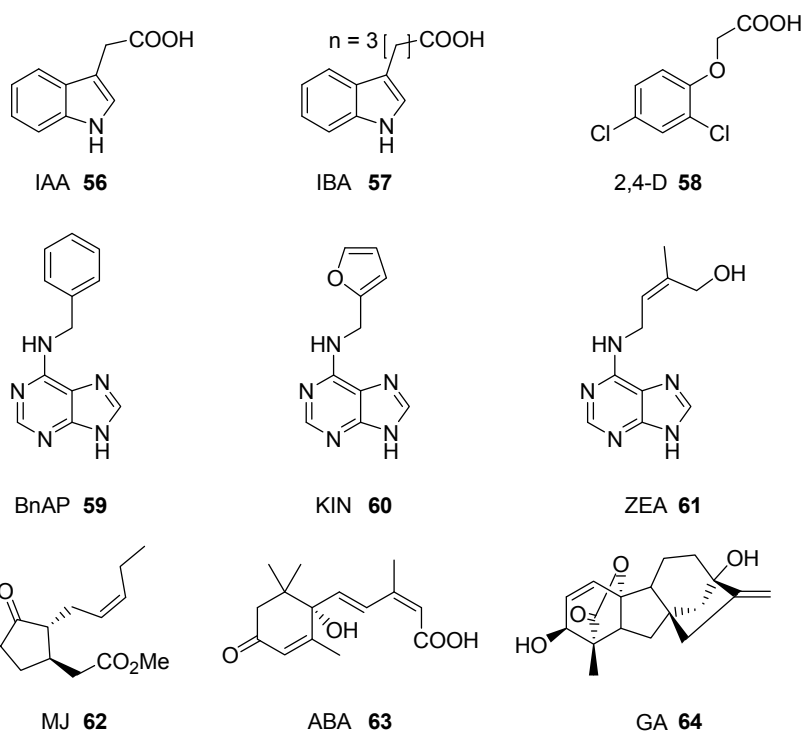
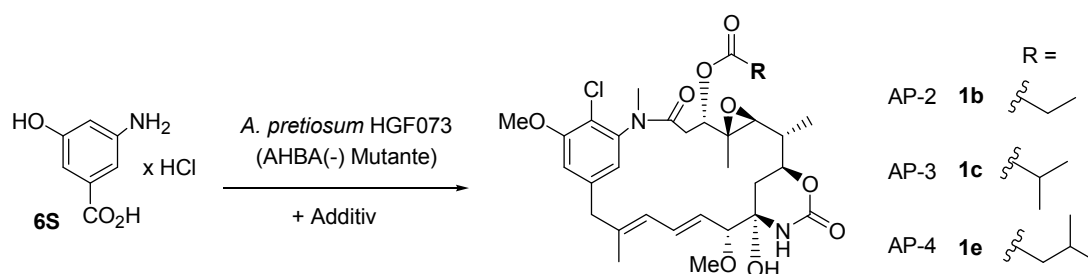
b) E. Strzelczyk, A. Pokojaska-Burdziej, *Plant Soil* **1984**, 81, 185-194.

¹¹² E. Matsukawa, Y. Nakagawa, Y. Iimura, M. Hayakawa, *Actinomycetologica* **2007**, 21, 32-39.

~ 150 nM unter den optimierten Bedingungen aus Kapitel 4.1.3 (3.3 % {v/v} Kokosnusswasser) nur eine Konzentration von ~1 µg/L (5 nM) im Fermentationsmedium erwartet werden, die somit deutlich von den beschriebenen Studien abweicht (*vide supra*).

4.1.4.2 Ergebnisse der Mutasynteseversuche

Zur systematischen Untersuchung der Effekte von Substanzen mit Phytohormon-Aktivität (Schema 32) auf die Ansamitocin-Produktion durch *A. pretiosum* HGF073 wurde eine Kultivierung in 24-Well-Platten vorgenommen.



Schema 32: Als produktionssteigernde Additive untersuchte Substanzen mit Phytohormon-Aktivität. Abkürzungen siehe Text.

Die Anzucht von Vorkulturen erfolgte wie üblich in Erlenmeyerkolben, mit denen daraufhin Hauptkulturen im 900 μ L-Maßstab inokuliert wurden, die unter Schütteln und durch Zusatz einer Glasperle durchmischt inkubiert wurden. Nach einer Anzuchtphase von drei Tagen in Gegenwart der jeweiligen Substanzen erfolgte in Analogie zu den unter 4.1.3.2 beschriebenen Optimierungsstudien die Zugabe einer Portion AHBA **6S**, woraufhin nach drei weiteren Tagen ein Abbruch der Fermentation erfolgte. Das verbliebende Restkulturvolumen von 640-645 μ L wurde dann einer Untersuchung durch analytische *reversed phase*-HPLC unterzogen.⁹⁷

In ersten Studien zeigte der als Stresshormon bei Pflanzen auftretende Methylester der Jasmonsäure (**62**, MJ)¹¹³ über einen Konzentrationsbereich von 1 mM bis 100 pM keinen produktionssteigernden Effekt (Abbildung 17). Während das synthetische Herbizid 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (**58**, 2,4-D) in den betrachteten Konzentrationen zu einer Verdoppelung der Ansamitocinproduktion führte, zeigten Kulturen unter Zusatz von IAA oder Gibberellinsäure A₃ (**64**, GA) deutlichere Antworten auf diese Signale. In weiteren Studien wurde die stimulierende Aktivität der Auxine IAA und Indol-3-buttersäure (**57**, IBA), sowie der Aminopurin-Derivate Kinetin (**60**, KIN), Zeatin (**61**, ZEA), N⁶-Benzyladenin (**59**, BnAP) und des Seneszenzhormons Abscisinsäure (**63**, ABA) über einen Konzentrationsbereich von 1 mM bis 1 aM untersucht. Während für alle Verbindungen unterhalb der Schwelle von 1 μ M zumindest eine Verdreifachung der Ansamitocinproduktion gegenüber Referenzkulturen ohne Zusatz festzustellen war, erwiesen sich insbesondere IAA, GA, BnAP und ABA als stark stimulierende Additive, wobei eine mindestens Verachtfachung der Ansamitocinproduktion festgestellt werden konnte. Für IAA konnte dies in einem Bereich von 100 nM bis 100 pM nachgewiesen werden, was einer Konzentration entspricht, die durch den vorgenommenen Zusatz von Kokosnusswasser zum Fermentationsmedium erreicht werden kann (*vide supra*). Kulturen mit Zusatz von GA zeigten die größten Produktionssteigerungen im nanomolaren Bereich, während dieser Effekt für BnAP besonders in picomolaren Konzentrationen auftrat. Unter Nutzung von ABA als Additiv konnte eine deutliche, stimulierende Wirkung bis in den femtomolaren Konzentrationsbereich beobachtet werden. Diese Werte sind allerdings im Zusammenhang der verwendeten Kultivierungsmethode zu sehen, da Kontrollkulturen hierbei nur einen Ansamitocin-Titer von 1.5 mg/L erreichten, während unter Stimulierung entsprechend durchschnittlich bis zu 15 mg/L erreicht wurden. Zur Übertragung der ermittelten Konzentrationen dieser

¹¹³ a) S. Blechert, W. Brodschelm, S. Hölder, L. Kammerer, T. M. Kutchan, M. J. Mueller, Z.-Q. Xia, M. H. Zenk, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 4099-4105; b) S. Cohen, E. Flescher, *Phytochemistry* **2009**, 70, 1600-1609.

suboptimalen Systeme auf das Standardsystem der Schüttelkulturen im Erlenmeyerkolbenmaßstab wären umfassende Studien nötig, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt werden konnten.

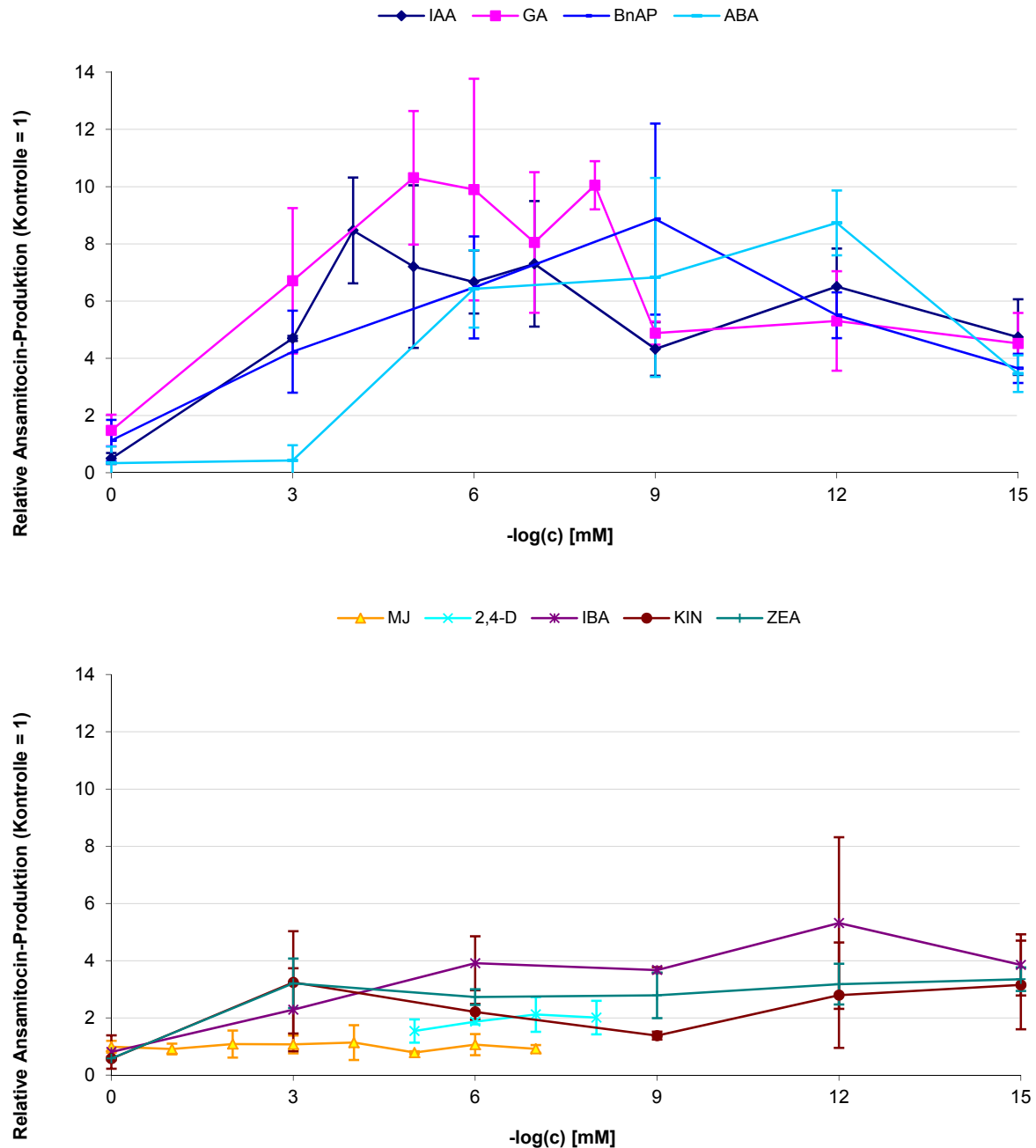


Abbildung 17: Relative Ansamitocin-Produktion (Summe AP-(2-4), **1b**, **1c**, **1e**) in Abhängigkeit von Additiven mit Phytohormon-Aktivität (Schema 32) im Vergleich zu Referenzkulturen ohne Zusätze. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung als Fehlerbalken (n = 3). Eine relative Ansamitocin-Produktion von 10 entspricht 15.4 mg/L. Der Variationskoeffizient der auf 1 kalibrierten Referenzkulturen beträgt 20 %.

Ein artifizierter Ersatz für den Zusatz von Kokosnusswasser wäre wünschenswert, wobei die hohe Komplexität dieses Additivs allerdings vermuten lässt, dass neben den Substanzen mit Phytohormon-Aktivität noch weitere, unbekannte Komponenten zur Aktivität des Kokosnusswassers beitragen.

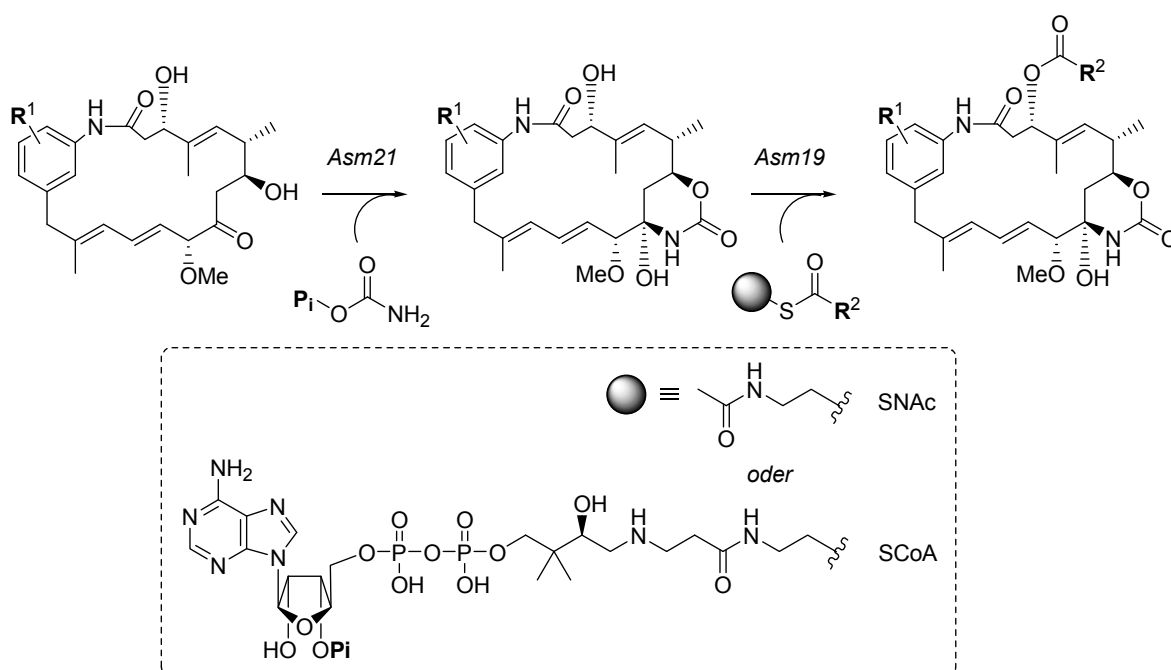
Aus den vorgelegten Daten sind allerdings bereits einige bemerkenswerte Aussagen abzuleiten. Während unter Konzentrationen im millimolaren Bereich wie in den einleitend beschriebenen Studien kein Effekt auftrat, reagierte *A. pretiosum* auf niedrige bis Spurenkonzentrationen bestimmter Phytohormone. Im Gegensatz zu den einleitend erwähnten Studien ist die Reaktion von *A. pretiosum* auf die Stimulanzien in Geringstkonzentrationen als spezifisch zu werten, während eine Wirkung in millimolarer Konzentration auch als unspezifischer Stress klassifiziert werden kann. Zudem wurden für strukturell ähnliche Substanzen bestimmte Präferenzen festgestellt. So ruft IAA deutlichere Effekte hervor als IBA, während überraschenderweise das unnatürliche Zytokinin BnAP eine höhere Produktivität auslöste als die natürlichen Derivate KIN und ZEA.

Prinzipiell können die untersuchten oder ähnliche Substanzen sowohl von Pflanzen, als auch von Mikroorganismen wie Bakterien und Pilzen produziert werden.¹¹⁰⁻¹¹² Somit kann auf Basis dieser Ergebnisse im Hinblick auf das aus pflanzlichem Material isolierte Maytansinoide (vgl Kapitel 2.1) keine direkte Interaktion zwischen Pflanze und Bakterium nachgewiesen werden. Vielmehr lässt sich die biologische Nische des Ansamitocin-Produzenten *A. pretiosum* im Gefüge der pflanzlichen Umgebung vermuten, die sich durch eine komplexe Gesellschaft von Bakterien und Pilzen auszeichnet.¹¹⁴ In dieser Umgebung beeinflusst die Pflanze die Mikroorganismen-Gesellschaft beispielsweise durch Ausscheidung des IAA-Vorläufers L-Tryptophan über Wurzelabsonderungen.^{110a} Die dadurch stimulierte mikrobielle IAA-Synthese kann auf die Pflanze und andere Mikroorganismen rückwirken, woraufhin auch weitere Phytohormon-aktive Substanzen durch Mikroorganismen zur Beeinflussung ihrer mikrobiellen Gesellschaft oder der Pflanze produziert werden.¹¹⁰⁻¹¹² Scheinbar nimmt *A. pretiosum* diese Signale wahr und reagiert entsprechend, was zumindest unter den Laborbedingungen zu einer Anregung der Ansamitocin-Produktion führt. Ob dies mit einer Intention der Unterdrückung konkurrierender Pilze durch Kampfstoffe des Ansamitocin-Typs verbunden ist, oder in einen komplexeren Zusammenhang gestellt werden muss, ist an dieser Stelle nicht zu beantworten.

¹¹⁴ F. Persello-Cartiaux, L. Nussaume, C. Robaglia, *Plant Cell Environ.* **2003**, 26, 189-199.

4.1.5 Vorarbeiten zur chemoenzymatischen Derivatisierung von Proansamitocin-Derivaten

In Kapitel 4.1.3 wurde die Darstellung von Ansamitocinen mit ungewöhnlichen Seitenketten mittels kombinierter Vorläufer-dirigierter Biosynthese und Mutasynthese vorgestellt. Ein prinzipieller Nachteil dieser fermentativen Ansätze besteht in der Komplexität des verwendeten Systems. So ist die Fermentationsführung als schwierig und langwierig einzustufen, wobei die zu erzielenden Ausbeuten zudem stark variieren können. Weiterhin können nur Vorläufer eingesetzt werden, die keine allzu hohe Toxizität zeigen, wobei nie ungewünschte Transformationen oder ein Abbau der xenobiotischen Bausteine ausgeschlossen werden kann. Aufgrund dieser Nebenreaktionen kann ein Fermentationssystem niemals die vollständige Substratflexibilität des für die Transformation vorgesehenen Biosynthesewegs offenbaren. Zudem gehen die oftmals erhaltenen Produktgemische mit Ausbeuteverlusten und beträchtlichen Komplikationen bei der Reinigung des Zielprodukts einher.



Schema 33: Essenzielle post-PKS-Modifizierungssequenz zur Erzeugung von biologisch aktiven Ansamitocin-Derivaten in kontrollierbaren *in vitro*-Enzymtransformationen. P_i = Phosphat (inorganic),¹¹⁵ SNAc = *S*-Acyl-*N*-Acetylcysteamine; SCoA = *S*-Acyl-Coenzym A.

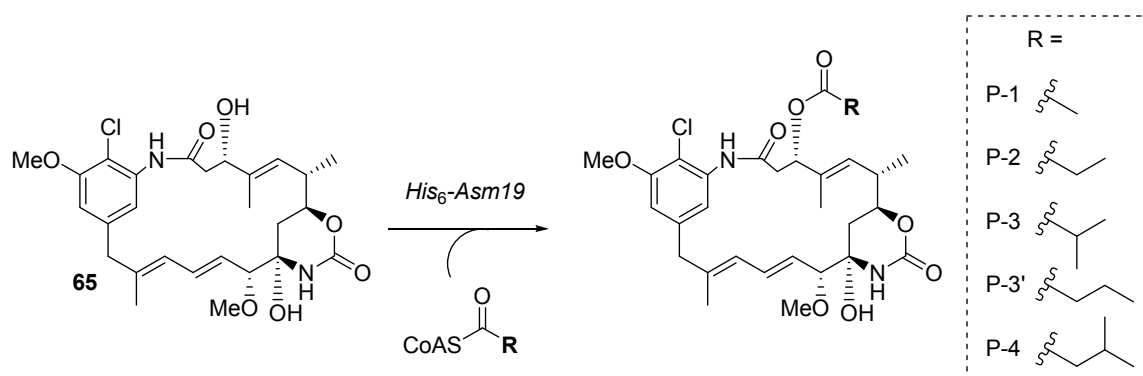
¹¹⁵ Vergleichbare Arbeit zur *in vitro*-Transformation mit einer Carbamoyltransferase: C. L. Freel Meyers, M. Oberthür, H. Xu, L. Heide, D. Kahne, C. T. Walsh, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 67-70.

Während die Darstellung der Ansamitocin-Grundstrukturen stets am einfachsten durch Fermentation erfolgen kann (vgl. Kap 4.1.1), so wäre eine Auslagerung der diversifizierenden post-PKS-Schritte auf kontrollierbare *in vitro*-Systeme wünschenswert. Hierfür bieten sich zunächst die 7-*O*-Carbamoyltransferase *Asm21* und die 3-*O*-Acyltransferase *Asm19* an, da sie die für eine biologische Aktivität essenziellen Strukturelemente in die Proansamitocin-Grundstruktur einführen (Schema 33). Eine Nutzung der eingeführten Strukturelemente für eine weitere chemische Derivatisierung könnte daraufhin erfolgen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Bereitstellung von Substraten und möglichen Cosubstraten der betreffenden Enzyme für zukünftige *in vitro*-Studien erfolgen, während die Klonierung und Expression der Enzyme aus den Arbeiten von ANJA HEUTLING resultieren würde.

4.1.5.1 Vorarbeiten

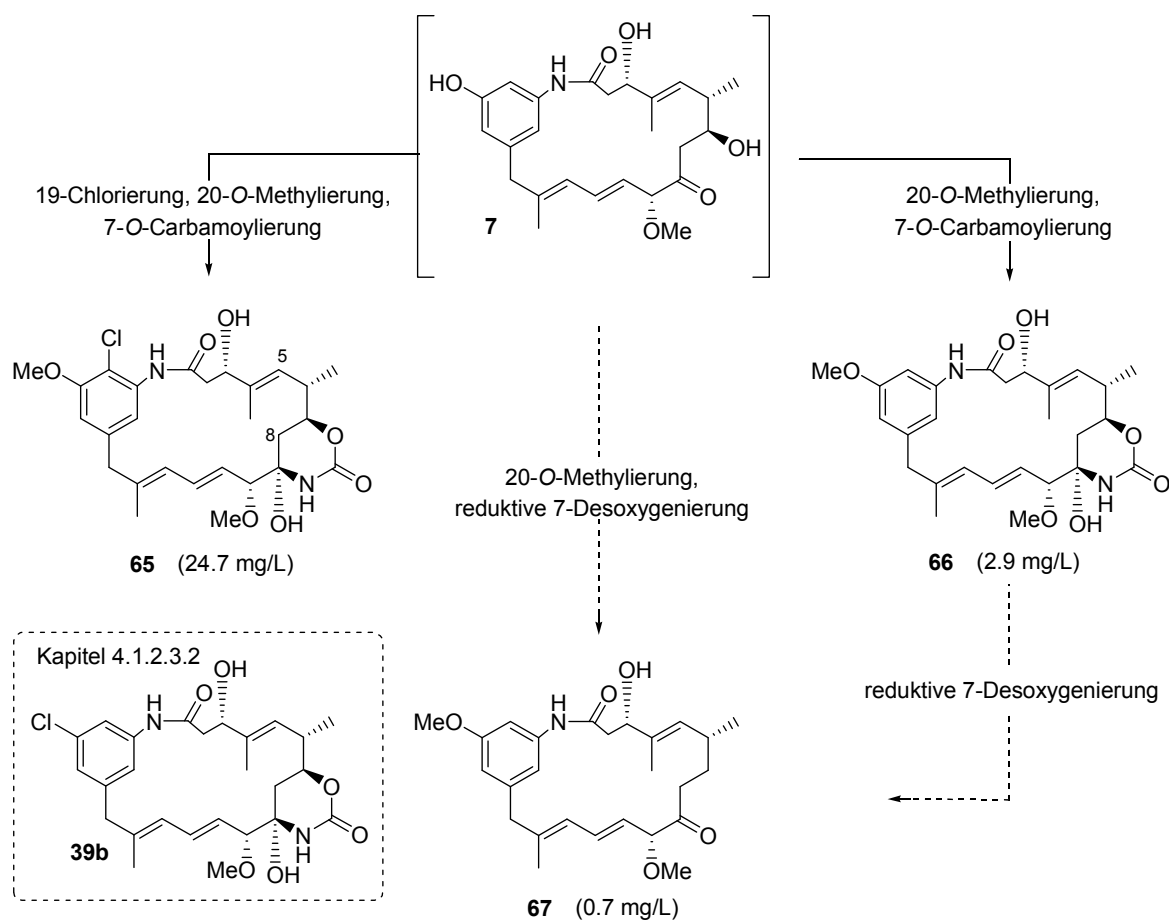
Der Nachweis der Aktivität einer heterolog in *Escherichia coli* exprimierten 3-*O*-Acyltransferase *Asm19* wurde bereits von MOSS *et al.* geführt.⁷⁹ Hierbei wurde *N*-Demethyl-4,5-deepoxymaytansinol **65** unter Zusatz von Coenzym A-Thioestern natürlich vorkommender Carbonsäuren mit dem zellfreien Extrakt der bakteriellen Zellen inkubiert, woraufhin eine massenspektrometrische Detektion der Produkte erfolgte (Schema 34). Eine Reinigung des mit einem *N*-terminalen His₆-Tag versehenen Proteins erfolgte nicht.



Schema 34: Vorarbeiten zur heterologen Expression und Aktivität einer rekombinanten Variante der Acyltransferase *Asm19*.

4.1.5.2 Fermentative Darstellung von Substraten

Für eine Carbamoylierung geeignete Proansamitocin-Substrate wurden bereits in den Kapiteln 4.1.1 und 4.1.2 beschrieben. Wie von SPITELLER *et al.*³³ und MOSS *et al.*⁷⁹ gezeigt werden konnte, müssen die Substrate der Acyltransferase *Asm19* eine 7-*O*-Carbamoylierung aufweisen und dürfen nicht 4,5-epoxidiert und *N*-methyliert sein. Die Erzeugung von Verbindungen mit einem für diese Transformation kompatiblen post-PKS-Modifizierungsmuster gelang bereits durch die in Kapitel 4.1.2 beschriebenen Mutasynthesen. In Analogie zu den Arbeiten von MOSS *et al.*⁷⁹ sollte allerdings auch die Darstellung des natürlichen Intermediats *N*-Demethyl-4,5-deepoxymaytansinol **65** durch Fermentation des von PETER SPITELLER bereitgestellten Stamms *A. pretiosum* HGF052 erfolgen (Schema 35). Diese Mutante weist eine Deletion im *asm19*-Gen auf und akkumuliert laut Literaturangabe nur den nicht acylierten Vorläufer **65**.³³



Schema 35: Nach Fermentation von *A. pretiosum* HGF052 isolierte Proansamitocin-Derivate im Kontext eines Vorschlags zu ihrer Biogenese. Gestrichelte Pfeile deuten alternative Biosynthesewege an.

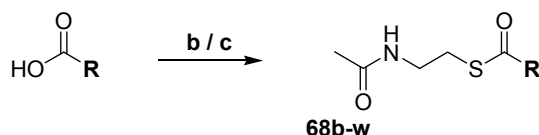
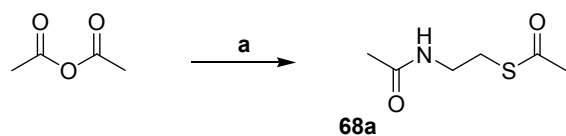
Nach erfolgter Selektion geeigneter Kolonien (vgl. Kap. 4.1.1), gelang die fermentative Darstellung von 23.7 mg des gewünschten Zielprodukts **65** in einer Fermentationsausbeute von ~25 mg/L. Diese Verbindung stellte zwar das Hauptprodukt der Fermentation dar, wurde allerdings von Nebenkomponenten begleitet, von denen zwei isoliert und NMR-spektroskopisch untersucht werden konnten. Die Charakterisierung der 7-*O*-carbamoylierten Verbindungen mit dem natürlichen Methoxy- und gegebenenfalls Chlor-Arylsubstitutionsmuster gestaltete sich als schwierig. Wie bereits von MOSS *et al.* beschrieben,⁷⁹ ergab insbesondere Verbindung **65** breite Signale mit geringer Intensität im Rahmen von NMR-Experimenten,¹¹⁶ was wahrscheinlich auf den langsamen Wechsel zwischen verschiedenen semi-stabilen Konformeren zurückzuführen ist. Allerdings konnte aufgrund der großen Substanzmengen eine Zuordnung der Signale unter Vergleich mit den eindeutigen spektroskopischen Daten des ähnlichen Mutaprodukts **39b** erfolgen (Schema 35). Deutlich besser stellte sich das ebenfalls isolierte Dechlor-Derivat **66** bei NMR-spektroskopischer Untersuchung dar. Während die Signale zwar schärfer als bei der zusätzlich halogenierten Substanz **65** erschienen, waren dennoch deutliche Verluste an Signalintensität im Vergleich zu Mutaprodukt **39b** zu beobachten. Somit kann die konformative Instabilität dieser Verbindungen auf Anwesenheit der sterisch anspruchsvollen Methoxy- und Chlorsubstituenten an der aromatischen Untereinheit zurückgeführt werden. Interessanterweise konnte auch aus der Fermentation der Mutante *A. pretiosum* HGF052 eine 7-desoxygenierte Verbindung **67** isoliert und vollständig charakterisiert werden, was die bereits in Kapitel 4.1.1 diskutierte These unterstützt, dass diese Verbindung nur aus einem carbamoylierten Vorläufer wie Derivat **66** erzeugt werden kann.

In Erweiterung der eingangs diskutierten Struktur-Aktivitäts-Beziehungen konnte Derivat **65** eine moderate zytotoxische Aktivität gegenüber bestimmten Zelllinien humanen Ursprungs nachgewiesen werden.^{55, 117} Insbesondere in Untersuchungen an U-937-Zellen (Leukämie) zeigten zudem die Verbindungen **66** und **67** eine vergleichbar hohe biologische Aktivität.

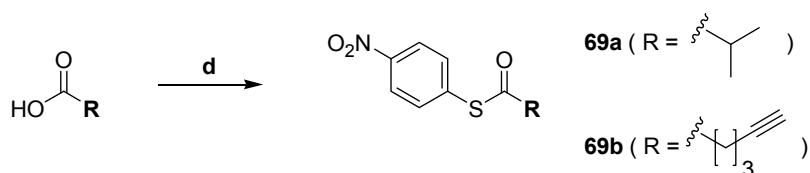
¹¹⁶ siehe Spektrenanhang.

¹¹⁷ vgl. Kapitel 4.1.1.5 und 4.1.2.4; IC₅₀-Werte [nM] (Zelllinie): **65** – (L-929) >800, (U-937) 28, (A-431) 224, (SK-OV-3) 170, (PC-3) 841, (MCF-7) 121, (HUVEC) 243; **66** – (L-929) >800, (U-937) 170, (A-431) >800, (SK-OV-3) >800, (PC-3) >800, (MCF-7) 559, (HUVEC) 959; **67** – (L-929) >900, (U-937) 453, (A-431) >900, (SK-OV-3) >900, (PC-3) >900, (MCF-7) >900, (HUVEC) >900.

4.1.5.3 Synthese von aktivierten Acyl-Cosubstraten



R =	Eintrag	Ausbeute (Methode)	R =	Eintrag	Ausbeute (Methode)
	68b (n = 1)	81 % (b)		68j (n = 0)	18 % (c)
	68c (n = 2)	69 % (b)		68k (n = 1)	– (b/c)
	68d (n = 3)	52 % (b)		68l (n = 2)	69 % (b)
				68m (n = 3)	48 % (b)
	68e (n = 0)	55 % (b)		68n (n = 4)	62 % (b)
	68f (n = 1)	90 % (b)		68o	24 % (b)
	68g (n = 0)	76 % (b)		68o (n = 3)	74 % (b)
	68h (n = 1)	85 % (b)		68q (n = 4)	70 % (b)
				68r (n = 5)	18 % (b)
	68i	56 % (b)		68s (n = 1)	34 % (b)
				68t (n = 2)	41 % (b)
				68u (n = 3)	60 % (b)
				68v (n = 4)	63 % (b)
				68w (X = H)	75 % (b)
				68x (X = I)	50 % (b)



Schema 36: Synthese von Thioestern potentieller Acylseitenketten. Bedingungen: a) *N*-Acetylcysteamin, Pyridin, RT, 68 %; b) *N*-Acetylcysteamin, EDC*HCl, DMAP, CH₂Cl₂, RT; c) *N*-Acetylcysteamin, DCC, CH₂Cl₂, -5 °C → RT; d) 4-Nitrothiophenol, EDC*HCl, DMAP, CH₂Cl₂, RT, 55 % (**69a**) / 19 % (**69b**).

Neben den Substraten der Acyltransferase sollte auch eine Bibliothek verschiedener Cosubstrate bereitgestellt werden, die einen Einblick in die Substratflexibilität des Acylierungsschritts erlauben würden (Schema 36).

Die Substrate wurden als aktivierte Thioester mit dem Coenzym A-Mimetikum *N*-Acetylcysteamin (SNAc) bereitgestellt. Neben Acylresten, die eine weitere chemische Modifizierung ermöglichen würden (**68j-r**, **68x**), wurde ein breites Spektrum an natürlich vorkommenden und unnatürlichen Substituenten in Betracht gezogen, das vor allem einer Charakterisierung der sterischen Limitierungen der Acyltransferase dienen würde.¹¹⁸

Die Synthese des Acetylthioesters **68a** erfolgte nach Literaturvorschrift unter Verwendung von Acetanhydrid,¹¹⁹ während für andere Acylreste üblicherweise das im Nachhinein durch einfache Waschschrte im sauren Milieu zu entfernende Carbodiimid-Kupplungsreagenz EDC*HCl unter Zusatz des STEGLICH-Katalysators DMAP verwendet wurde.¹²⁰ Die Darstellung des Propiolyl-SNAcs **68j** gelang allerdings nicht unter diesen Bedingungen, woraufhin auf das in der Literatur für diese Reaktion beschriebene Kupplungsreagenz DCC zurückgegriffen wurde.¹²¹ Ähnliche Probleme, die mit einer Schwarzfärbung der Ansätze nach kurzer Reaktionszeit einhergingen, traten auch mit dem vergleichbaren Michael-Akzeptor 3-Butinsäure auf (s. **68k**), wobei die Synthese auch unter Alternativbedingungen misslang. Diese chemische Instabilität wäre auch in der enzymatischen Umgebung zu erwarten, so dass keine weiteren Versuche zur Darstellung von **68k** unternommen wurden.

Für kinetische Studien zur Enzymaktivität wäre eine in Echtzeit zu verfolgende Reaktion wünschenswert. Hierfür wurden die chromogenen Thioester **69a/b** bereitgestellt, die nach erfolgter Spaltung den Farbstoff *p*-Nitrothiophenolat freisetzen würden.¹²² Somit könnte eine Umsetzung des Cosubstrats photometrisch (bei $\lambda = 410$ nm) verfolgt werden. In zukünftigen Studien wäre allerdings zunächst zu klären, ob das Enzym die unnatürlichen Cosubstrate akzeptiert und ob sich die relativ hohe chemische Reaktivität dieser Acylierungsreagenzien als kompatibel mit den gewählten Reaktionsbedingungen erweist.

¹¹⁸ 6-Azidocaprinsäure (für **68r**) wurde von Yi SU bereitgestellt.

¹¹⁹ F. J. McQuillin, J. Stewart, *J. Chem. Soc.* **1955**, 2966-2967.

¹²⁰ W. Steglich, G. Höfle, *Angew. Chem.* **1969**, 81, 1001.

¹²¹ R. M. Mizanur, F. A. Jaipuri, N. L. Pohl, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 836-837.

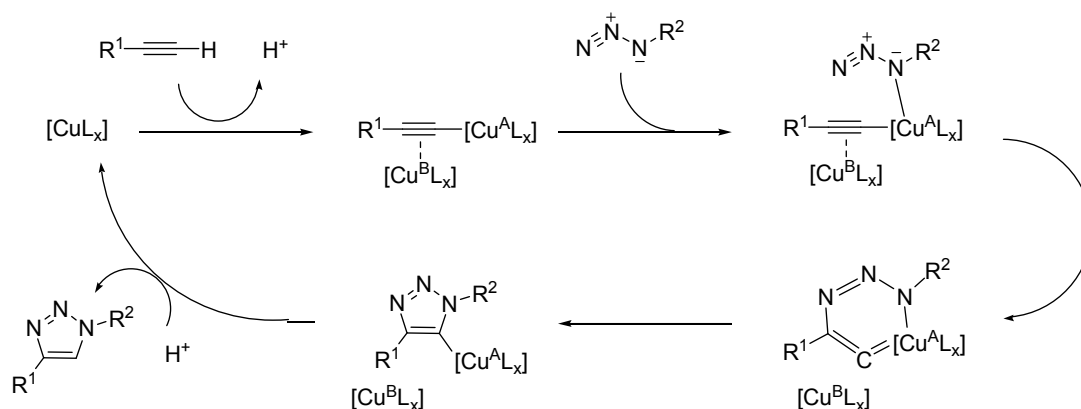
¹²² a) A. E. Vatter, O. K. Reiss, J. K. Newman, K. Lindquist, E. Groeneboer, *J. Cell Biol.* **1968**, 38, 80-98;

b) J. Kalia, R. T. Raines, *ChemBioChem* **2006**, 7, 1375-1383.

4.1.6 Semisynthetische „Click“-Derivatisierungen

Wie bereits einleitend in Kapitel 2.1 beschrieben wurde besteht ein Interesse zur Verknüpfung der hochaktiven Wirkstoffe des Ansamitocin- und Maytansin-Typs mit Tumor-gerichteten Partnern wie monoklonalen Antikörpern oder Folsäure. Generell erfordert die Synthese dieser Konjugate eine chemische Verknüpfung von Molekülen, die sich durch komplexe Strukturen mit zahlreichen funktionellen Gruppen auszeichnen. Dies stellt hohe Ansprüche an die Selektivität und Reaktionsbedingungen der Konjugatchemie, wobei für die Synthese der maytansinoiden Konjugate bisher vor allem auf Disulfidbrückenaustauschreaktionen zurückgegriffen wurde.^{16,36}

Allerdings bietet sich mit der 1,3-dipolare Zykladdition nach HUISGEN¹²³ ein weiterer Reaktionstyp an, der diesen Ansprüchen gerecht werden kann und bisher nicht für semisynthetische Arbeiten an Strukturen des Ansamitocin-Typs beschrieben wurde. Hierbei kann unter den milden Bedingungen von Kupfer(I)-Katalyse nach SHARPLESS und MELDAL bei Raumtemperatur die Verknüpfung einer Azido- und terminalen Alkinverbindung durch Ausbildung eines 1,4-disubstituierten 1,2,3-Triazols erreicht werden (Schema 37; Kupfer-katalysierte Alkin-Azid-Zykladdition - CuAAC).^{85, 124}



Schema 37: Mechanistischer Vorschlag zur CuAAC (modifiziert nach HEIN *et al.*).⁸⁵

¹²³ R. Huisgen, in *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry*, Wiley, New York **1984**, 1-176.

¹²⁴ a) V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599;
b) C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3062.

Dieser Reaktionstyp weist neben hohen Reaktionsraten und Selektivitäten auch eine breite Kompatibilität zu vielen funktionellen Gruppen auf. In der Tat wird die CuAAC aufgrund ihrer hohen Effizienz häufig mit dem von SHARPLESS eingeführten, prozesstechnisch geprägten Begriff der „Click“-Chemie¹²⁵ gleichgesetzt und findet mittlerweile breite Anwendung in chemisch und biologisch geprägten Disziplinen.¹²⁶ Eine Synthese entsprechender Konjugate unter Triazol-Bildung kann auch ohne Kupfer(I)-Katalyse unter thermischen Bedingungen oder durch Verwendung Ringspannungs-aktivierter Alkin-Derivate erfolgen, wobei allerdings keine Regioselektivität bei der 1,3-dipolare Zykoaddition gegeben ist.¹²⁷

In Kapitel 4.1.3 wurde die fermentative Erzeugung von Ansamitocin-Derivaten mit terminalen Alkynyl- und Azido-Funktionalitäten vorgestellt, die sich für eine weitere chemische Derivatisierung unter „Click“-Bedingungen eignen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Umsetzung der fermentativ dargestellten Alkynyl-Ansamitocine **44** und **45** unter Kupfer(I)-Katalyse mit synthetisch erzeugten Azido-Bausteinen erprobt werden. Das erzeugte Azido-Ansamitocin **49** kann hingegen in zukünftigen Studien zur Kupfer-freien „Click“-Chemie mit Ringspannungs-aktivierten Alkinen Verwendung finden (Kapitel 5.2).

4.1.6.1 Vorarbeiten

In der Literatur ist ein maytansinoides Disulfiddimer **72** beschrieben, das im Vergleich zum entsprechenden Monomer **70** mit freier Sulfhydryl-Funktion eine rund 180-fach höhere Aktivität gegenüber KB Tumorzellen gezeigt hatte (Abbildung 18).¹⁶ Allerdings wies auch das entsprechende Methyldisulfid-Monomer **71** IC₅₀-Werte im Bereich von 1 pM auf, was einer rund 20-fach höheren Aktivität des im Rahmen dieser Studien von WIDDISON *et al.* als Referenzsubstanz untersuchten Maytansins **2a** entsprach. So kann die hohe Aktivität von Derivat **72** ausschließlich auf die Schützung der Sulfhydryl-Gruppe im extrazellulären Milieu zurückgeführt werden, während nach erfolgter Aufnahme durch das reduzierende intrazelluläre Milieu eine Freisetzung von **70** zu vermuten wäre.¹⁵

¹²⁵ H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.

¹²⁶ Eine Übersicht gibt: J.-F. Lutz, Z. Zarafshani, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, *60*, 958-970.

¹²⁷ Eine Übersicht gibt: E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974-6998.

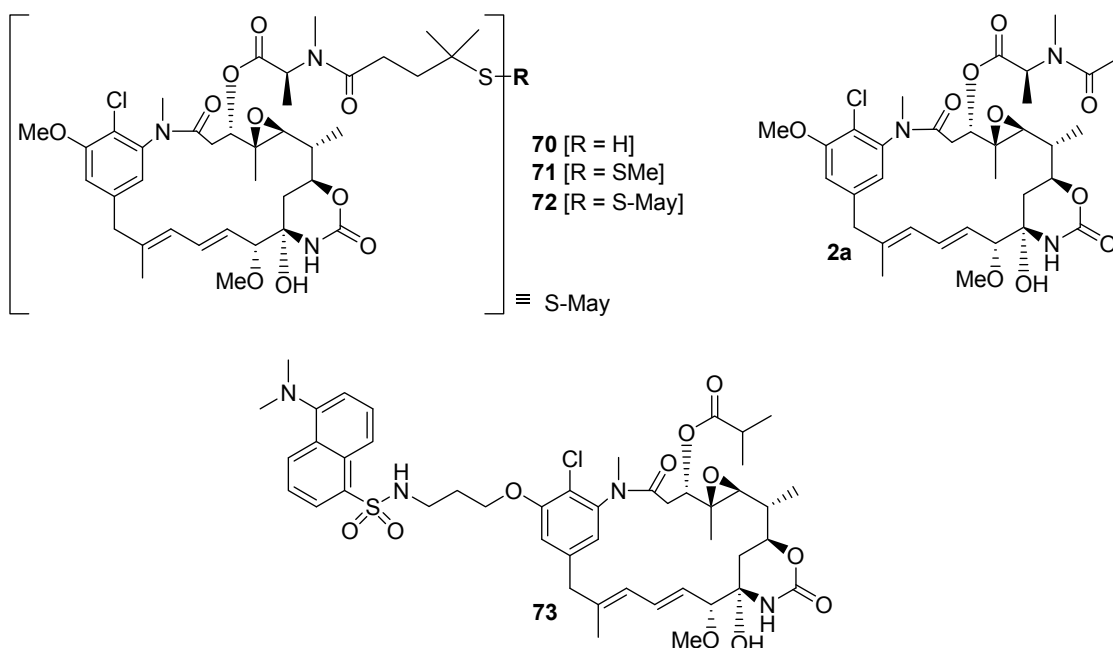


Abbildung 18: In der Literatur beschriebenes maytansinoides Dimer **72** im Vergleich mit ähnlichen Derivaten **70-71** und Maytansin **2a**¹⁶, sowie ein Fluoreszenz-Farbstoff markiertes AP-3-Derivat **73**.¹²⁸

Insbesondere bei Tumor-gerichteten Konjugaten ist es wünschenswert, dass die zytotoxische Komponente eine möglichst hohe Aktivität aufweist, da so nach Anlieferung des Wirkstoffs durch die zielgerichtete Komponente ein möglichst großer Effekt erreicht werden kann. Könnten durch Dimerisierung von maytansinoiden Grundstrukturen Verbindungen mit mehr als doppelt so hohem zytotoxischem Potential erzeugt werden?

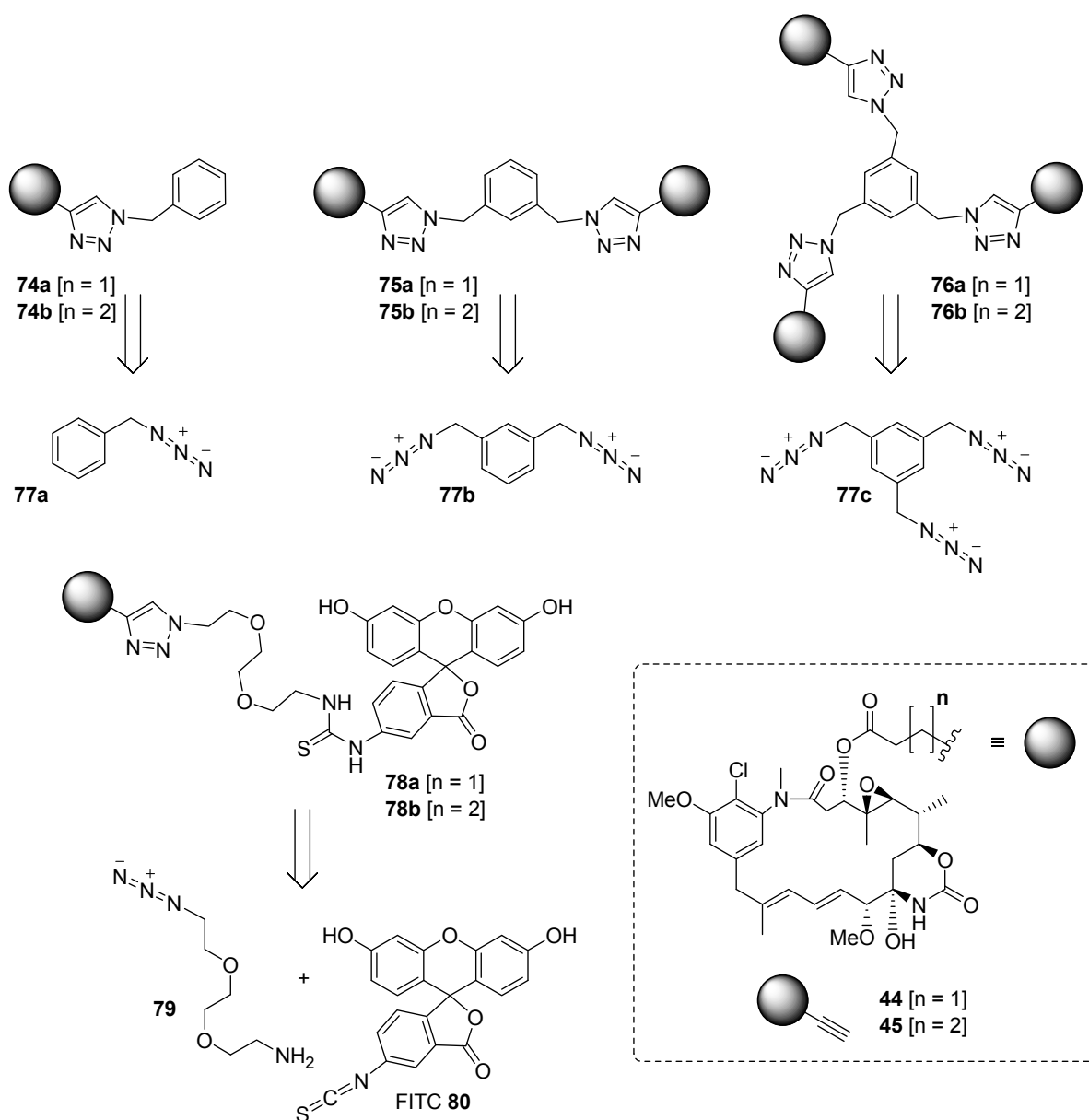
Bereits in Arbeiten von SAWADA *et al.* hatte sich ein mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiertes AP-3-Derivat **73** als geeignetes Werkzeug für Studien zur Untersuchung der Tubulin-Bindestellen erwiesen (Abbildung 18).¹²⁸ In Erweiterung dieser Arbeiten könnten sich durch CuAAC erzeugte Ansamitocin-Derivate mit Fluorophoren für Studien eignen, in denen die Depolymerisierung von Mikrotubuli *in vitro* fluorimetrisch verfolgt werden kann, wobei eine Detektion der Wirkstoffbindung an Proteine durch Fluoreszenzpolarisierung des Farbstoffs stattfindet.¹²⁹

¹²⁸ T. Sawada, Y. Kato, H. Kobayashi, Y. Hashimoto, T. Watanabe, Y. Sugiyama, S. Iwasaki, *Bioconjugate Chem.* **1993**, *4*, 284-289.

¹²⁹ Review: M. Leopoldo, E. Lacivita, F. Berardi, R. Perrone, *Drug Discov. Today* **2009**, *14*, 706-712; Anwendungsbeispiel FK506-Bindeproteine: C. Kozany, A. März, C. Kress, F. Hausch, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1402-1410.

4.1.6.2 Synthese der Azidoverbindungen

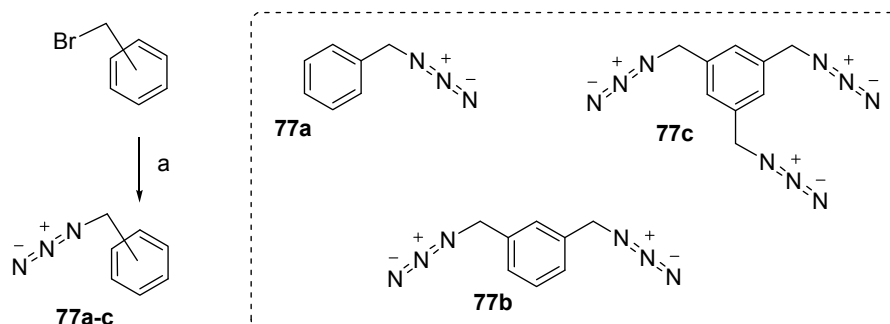
Mit dem Ziel, nicht spaltbare Dimere **75** zu synthetisieren wurde Benzylazid **77b** als verknüpfendes Element gewählt, das sich als kompakte, planare Plattform zum Aufbau symmetrischer Dimere eignen würde (Schema 38). Entsprechend in *meta*-Position zusätzlich funktionalisierte Derivate der Verbindungen **75** würden sich in zukünftigen Studien zur Anknüpfung von Tumor-gerichteten Molekülen eignen, wobei durch die arylische Verknüpfungsplattform stets eine Symmetrie gewahrt bliebe und keine unnötigen Stereozentren in die hochkomplexe Struktur eingeführt würden.



Schema 38: Retrosynthetische Betrachtungen zur Synthese der Ansamitocin-Derivate **74-76** und des Fluorescein-markierten Ansamitocin-Derivats **78**.

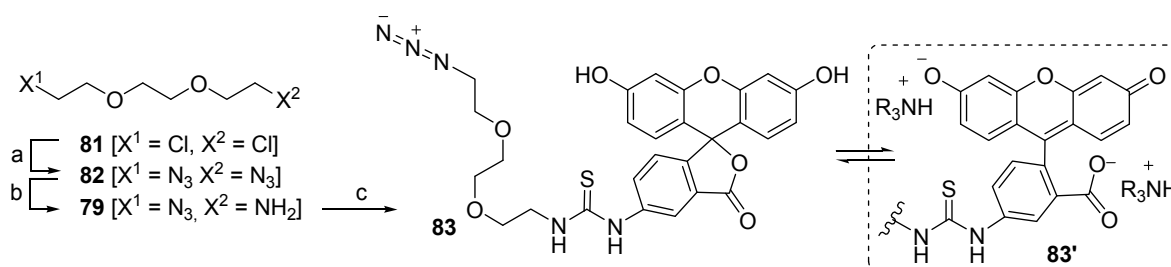
Zur Einschätzung der biologischen Aktivität der Dimere **75** sollten zudem vergleichbare Monomere **74** und Trimere **76** aus den jeweiligen Benzylaziden **77a** und **77c** erzeugt werden. Während die Benzylazide **77** chemisch wenig komplexe Partner für eine Verknüpfung darstellen, sollte als anspruchsvolleres Beispiel die Anknüpfung eines Fluoreszenzfarbstoffs erfolgen. Als Fluorophor wurde ein Farbstoff des Fluorescein-Typs gewählt, der aus dem kommerziell erhältlichen Isothiocyanat **80** und dem als polaren Abstandshalter vorgesehenen Aminobaustein **79** hergestellt werden sollte.

Die Darstellung der Benzylazide **77a-c** gelang durch Substitution der entsprechenden, kommerziell erhältlichen Benzylbromide unter Verwendung von Natriumazid in Dimethylformamid (Schema 39).



Schema 39: Synthese der Benzylazide **77**. Bedingungen: a) NaN_3 , DMF, 85°C , **77a**: 81 %, **77b**: 99 %, **77c**: quant.

In analoger Weise wurde Diazid **82** aus der entsprechenden Dichlorverbindung **81** erzeugt, wobei zusätzlich Natriumiodid als Katalysator Verwendung fand (Schema 40).



Schema 40: Synthese des Fluorescein-Derivats **83** und Darstellung der chinoiden Form des Fluorophors. Bedingungen: a) NaN_3 , NaI (kat.), DMF, 60°C \rightarrow 80°C , 96 %; b) PPh_3 , 0.1 M $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{Et}_2\text{O}$, RT, 53 %; c) FITC **80**, DIPEA, MeOH/MeCN, RT, 80 %.

Mittels eines literaturbekannten Verfahrens¹³⁰ gelang die Desymmetrisierung von Azid **82** mittels Staudinger-Reduktion in einem sauren, biphasischen System. Das erhaltene Amin **79** wurde daraufhin mit Fluorescein-5-isothiocyanat **80** (FITC) umgesetzt, wobei unter Ausbildung eines Thioharnstoffs Fluorescein-Derivat **83** erzeugt wurde. Die Reinigung des polaren Farbstoffs **83** erfolgte durch *reversed phase*-HPLC, wobei ohne Säurezusatz zunächst Verbindung **83'** in chinoider Form als Organosalz mit zwei Äquivalenten Amin-Base erhalten wurde (DIPEA und Amin **79**). Eine erneute Reinigung unter Zusatz von Trifluoressigsäure lieferte dann Verbindung **83**, der aufgrund von NMR-Vergleichsdaten die dargestellte, vornehmlich phenolische Form des Fluoresceins zugewiesen werden konnte.¹³¹

4.1.6.3 „Click“-Synthesen mit Ansamitocin-Derivaten

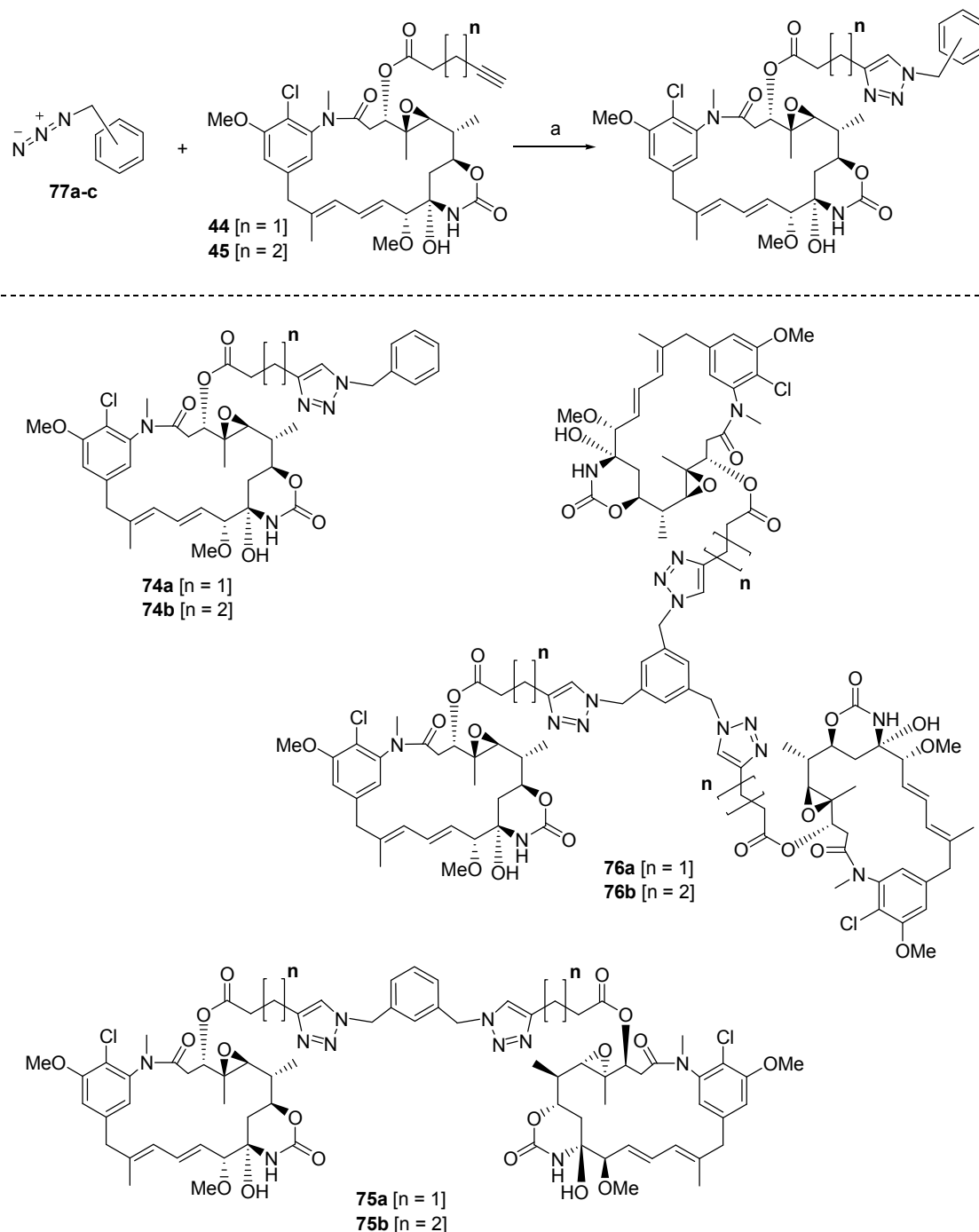
Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Reaktionen wurde ein Maßstab von 2 µmol, beziehungsweise 1.3 mg Ansamitocin-Edukt gewählt. Die zu erwartenden Produktmengen würden für eine biologische Charakterisierung mehr als genügen und zudem eine komfortable Menge für NMR-spektroskopische Untersuchungen darstellen. Eine Reinigung der Substanzen würde grundsätzlich durch *reversed phase*-HPLC erfolgen. Aufgrund der geringen Ansatzgrößen und hochtoxischen Eigenschaften der Ansamitocin-Derivate sollte zudem die Handhabung auf ein Minimum reduziert werden, wobei nach erfolgter Reaktion eine direkte Injektion der Reaktionsmischung in ein HPLC-System anvisiert wurde.

Eine Umsetzung der Ansamitocin-Derivate **44** und **45** zu neuen Derivaten gelang in Methanol unter Verwendung des darin teilweise löslichen Kupfer(I)bromids mit DIPEA als zusätzlich komplexierender Aminobase (Schema 41). Bei Verwendung substöchiometrischer Mengen des Kupfer(I)-Katalysators konnte nach massenspektrometrischer Reaktionskontrolle kein vollständiger Umsatz innerhalb von 24 Stunden bei Raumtemperatur erreicht werden. Zudem konnte im Verlauf der Reaktion eine deutliche Reduktion der Signalintensitäten bei massenspektrometrischer und *reversed phase*-HPLC-Analyse beobachtet werden. In Verbindung mit einer grundsätzlich auftretenden Trübung der Reaktionsmischung war dieses Phänomen vermutlich auf die Ausbildung von unlöslichen Kupferkomplexen der Ansamitocin-Derivate zurückzuführen. In der Tat bietet die Ansamitocin-Grundstruktur für

¹³⁰ A. W. Schwabacher, J. W. Lane, M. W. Schiesher, K. M. Leigh, C. W. Johnson, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 1727-1729.

¹³¹ Vgl. Experimenteller Teil; U. Anthoni, C. Christophersen, P. H. Nielsen, A. Püschl, K. Schaumburg, *Structural Chemistry* **1995**, *6*, 161-165.

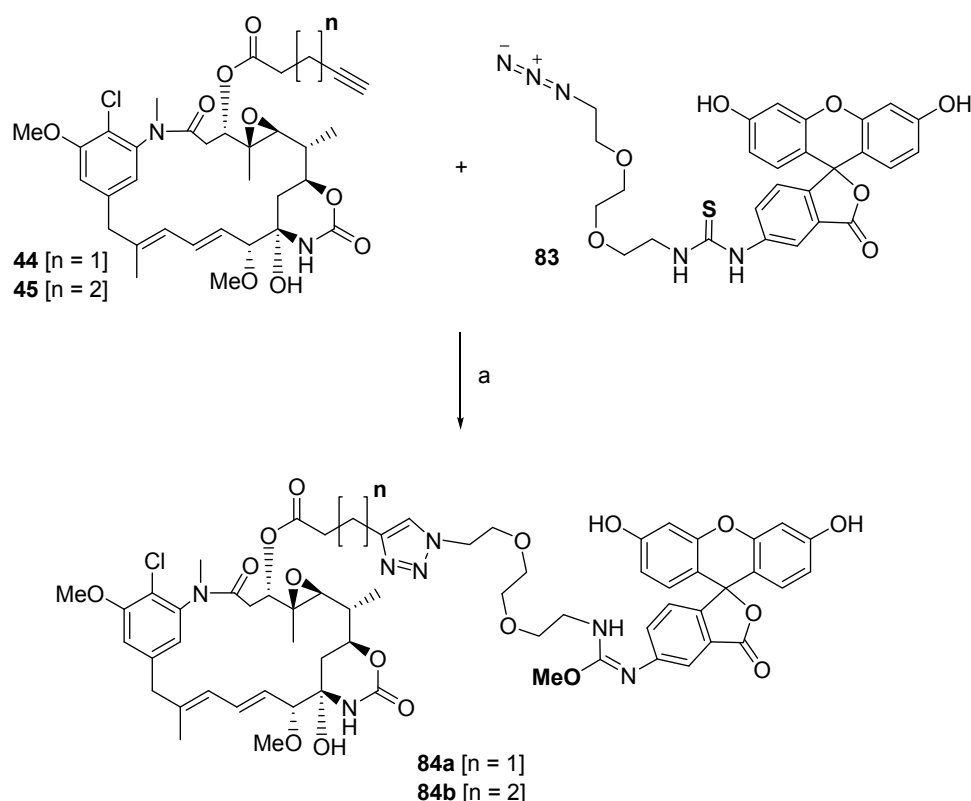
eine solche Komplexierung zahlreiche geeignete Heteroatome. Grundsätzlich wurde für die vorgenommenen Reaktionen Kupfer(I)bromid im Überschuss eingesetzt.



Schema 41: Synthese der Ansamitocin-Oligomeren **74-76**. Bedingungen: a) CuBr, DIPEA, RT, MeOH; Azid **77a** → **74a**: 75 %, **74b**: 90 %; Azid **77b** → **75a**: 74 %, **75b**: quant.; Azid **77c** → **76a**: 42 %, **76b**: quant.

Während die eingesetzten Kupfermengen bei den in dieser Arbeit vorgenommenen Reaktionen im Maßstab von ~1 mg eine eher geringe Rolle spielten, musste eine Freisetzung

der Produkte aus den vermuteten Kupferkomplexen erreicht werden. Nach Ablauf der unter Schutzgas durchgeführten Reaktionen wurde nach Belüftung im Überschuß eine Lösung des Kupfer(II)chelators EDTA¹³² zu den Reaktionsmischungen gegeben. Nach Klärung des Gemischs durch einen Spritzenfilter konnte direkt eine HPLC-Reinigung erreicht werden, wonach die Isolierung der entsprechenden Produkte in guten bis exzellenten Ausbeuten gelang (Schema 41). Generell ergab die Umsetzung des längerkettigen Ansamitocin-Derivats **45** bessere Ausbeuten, während in HPLC-Chromatogrammen nach Umsetzung des Alkins **44** teils unbekannte Nebenprodukte in geringen Mengen auftraten.



Schema 42: Synthese der Fluorescein-Derivate **84**. Bedingungen: a) CuBr, DIPEA, RT, MeOH, **84a**: 50 %, **84b**: 75 %.

Im Rahmen der Synthese der Fluorescein-markierten Ansamitocin-Derivate konnten die erwarteten Produkte **78a/b** nur massenspektrometrisch als Zwischenprodukt detektiert werden (vgl. Schema 38). Unter vollständigem Umsatz des Edukts traten Verbindungen auf, die massenspektrometrisch eine Differenz von 2 Masseneinheiten zu den erwarteten Produkten aufwiesen. Zudem war ein dunkler Niederschlag in der Reaktionsmischung zu beobachten.

¹³² EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure; Untersuchungen zur Kupfer-Chelatisierung: W. Z. Kociałkowski, J. B. Diatta, W. Grzebisz, *Pol. J. Environ. Stud.* **1999**, 8, 149-154.

Die zugewiesene Summenformel ließ auf den Verlust des Thioharnstoff-Schwefels und den Gewinn einer CH_2O -Einheit in der Esterseitenkette schliessen.¹³³ In Kombination mit den nach Reinigung erhaltenen NMR-Daten konnte den erhaltenen Produkten das Strukturelement eines *O*-Methylisoharnstoffs anstatt des erwarteten Thioharnstoffs zugeordnet werden (Schema 42). Verbindungen dieses Typs können als Methylierungsreagenzien verwendet werden, wobei das entsprechende Harnstoffderivat als Nebenprodukt anfällt.¹³⁴ Die Verbindungen **84** erschienen allerdings als stabil, was wohl auf die ausgeprägte Mesomerie des Isoharnstoff-Strukturelements mit dem aromatischen System der Fluorescein-Untereinheit zurückzuführen ist. In der Tat finden in der Literatur nur *N,N*-Dialkyl-substituierte *O*-Methylisoharnstoffe als Methylierungsreagenzien Anwendung.¹³⁴ Diese können einfach aus kommerziell erhältlichen Carbodiimiden wie DIC oder DCC unter Kupfer(I)- oder Kupfer(II)-Katalyse in Methanol erzeugt werden.¹³⁵

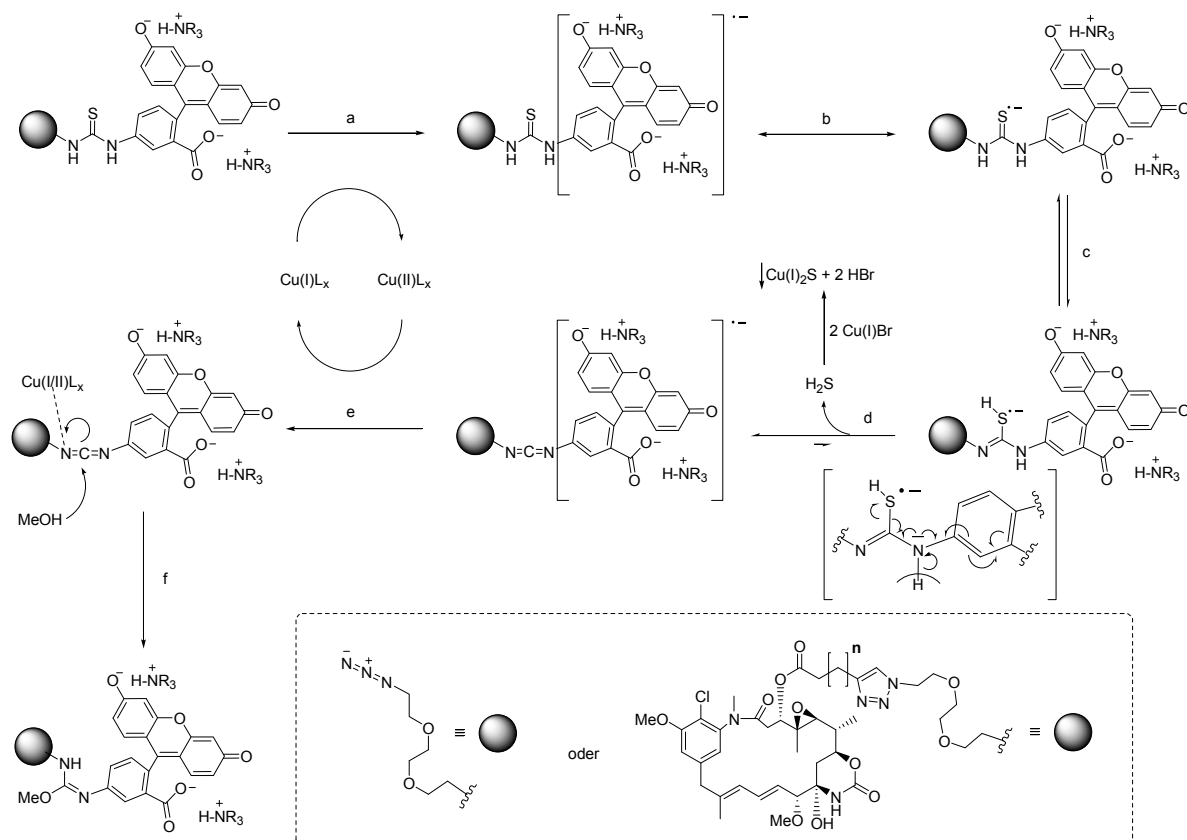
In Verbindung mit der von BORAH¹³⁶ beschriebenen radikalischen Desulfurierung von Thioharnstoff in ethanolischer Lösung unter Zusatz von Kupfer(I)chlorid und Naphthalen kann ein mechanistischer Vorschlag für die Umsetzung zu den erhaltenen Verbindungen **84** formuliert werden (Schema 43). Der bizyklische aromatische Kohlenwasserstoff Naphthalen erweist sich nach BORAH als Elektronentransfermittel, indem unter Oxidation von Kupfer(I) ein aromatisch delokalisiertes Radikalanion erzeugt wird, das daraufhin auf den Schwefel des eingesetzten Thioharnstoffs übertragen wird.¹³⁶ Im vorliegenden Beispiel könnte sich die in der basischen Reaktionslösung in Form eines ausgedehnt konjugierten, chinoiden Systems vorkommende Fluorescein-Einheit als vergleichbarer Radikalüberträger erweisen (a). Durch Mesomerie kann das Radikal auf den Schwefel des Thioharnstoff delokalisiert werden (b). Die erhöhte Elektronendichte ermöglicht dann eine tautomere Protonierung des Schwefelzentrums (c), woraufhin nach radikalischer Rekombination Schwefelwasserstoff eliminiert werden kann (d). Dieser könnte nachfolgend als Kupfersulfid präzipitieren, und so eine Erklärung für den beobachteten dunklen Niederschlag bieten. Das verbleibende, aromatisch delokalisierte Radikalanion könnte daraufhin durch Kupfer(II) oxidiert werden (e), während unter entsprechender Metallkatalyse eine Addition von Methanol an das entstandene Carbodiimid erfolgen kann (f). Als Produkt dieser Sequenz würden die isolierten *O*-Methylisoharnstoff-Derivate **84** erhalten werden.

¹³³ Bestimmt durch MS/MS-Fragmentierungsexperimente.

¹³⁴ Reviews: a) Lamoureux, C. Agüero, *Arkivoc* **2009**, 251-264; b) L. J. Mathias, *Synthesis* **1979**, 561-576.

¹³⁵ vgl. Ref. 134b); Methode nach E. Schmidt, F. Moosmüller, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1955**, 597, 235-240.

¹³⁶ D. Borah, *Sep. Purif. Technol.* **2005**, 43, 215-219.

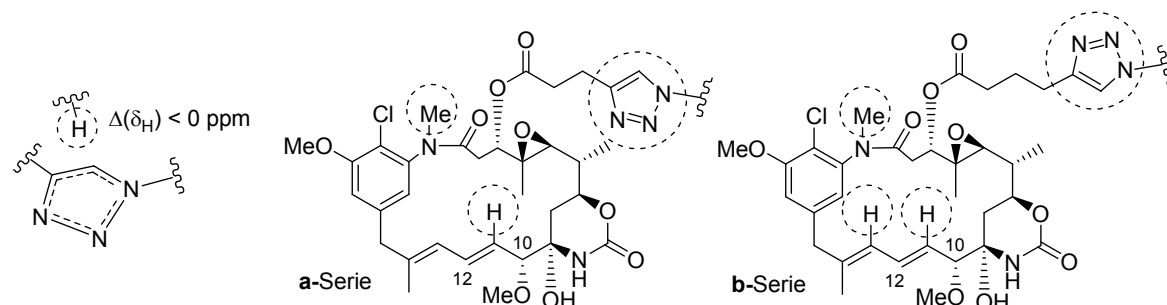


Schema 43: Vorschlag eines radikalischen Mechanismus zur Überführung eines Thioharnstoffs in einen *O*-Methylisoharnstoff unter Verwendung des chinoiden Fluorophoren-Systems als Elektronentransfermittel. Schritte: a) Reduktion durch Kupfer(I); b) Mesomerie-Delokalisierung des Radikalanions; c) Protonierung am Schwefel durch Tautomerie; d) Radikalische Rekombination und Schwefelwasserstoff-Eliminierung; e) Oxidation durch Kupfer(II); f) Kupfer-katalysierte Addition von Methanol.

In NMR-spektroskopischen Untersuchungen war bei sämtlichen erzeugten Derivaten ein vergleichbarer Einfluss auf die Protonen der Ansamitocin-Grundstruktur durch Ringstromeffekte eines Aromaten festzustellen (Abbildung 19).

Während exemplarisch an Verbindung **75b** durchgeführte selektive nOe-Experimente keinen Kontakt des aromatischen Triazol-Protons zur Grundstruktur feststellen ließen, so deuten die zu beobachtenden Verschiebungen auf die Anwesenheit und Lage des Triazols an. Ein Einfluss der weiteren eingeführten aromatischen Strukturelemente der Konjugate **74-76** auf die Grundstruktur ist möglich, da das Phänomen jedoch auch bei den mit einem Abstandhalter versehenen Fluorescein-Konjugaten **84** auftrat, erscheint die Abschirmung bestimmter Protonen wohl vor allem auf das Triazol zurückzuführen zu sein. Während bei aus Ansamitocin-Derivat **44** hervorgehenden Konjugaten vor allem die *N*-Methylgruppe und das Proton an Position 11 deutliche Abschirmungen erfahren, tritt bei den Derivaten mit längerer Seitenkette dieser Effekt zusätzlich bei dem Proton an Position 13 auf. Ausgeprägte

Abschirmungseffekte treten nur bei Protonen auf, die innerhalb der Makrolaktamstruktur liegen können. Dies lässt vermuten, dass der Aromat in mehr (Serie **a**) oder weniger (Serie **b**) zentraler Position hinter der Makrolaktamgrundstruktur liegt.



Substanz	Proton-Position, chemische Verschiebung δ_H [ppm] und deren Abweichung					
	10	10-OMe	11	12	13	N-Me
Edukt 44	3.59	3.37	5.61	6.63	6.27	3.16
74a	-0.03	-0.05	-0.16	-0.03	-0.06	-0.13
75a	-0.02	-0.05	-0.12	-0.02	-0.01	-0.19
76a	-0.01	-0.05	-0.09	-0.01	+0.03	-0.26
84a	-0.01	-0.02	-0.11	-0.03	-0.03	-0.15
Edukt 45	3.58	3.37	5.62	6.63	6.32	3.16
74b	-0.03	0.00	-0.22	-0.06	-0.22	-0.15
75b	-0.04	-0.01	-0.23	-0.05	-0.21	-0.13
76b	-0.02	-0.02	-0.23	-0.04	-0.19	-0.11
84b	-0.03	-0.02	-0.20	-0.04	-0.15	-0.07

Abbildung 19: Einfluss des Triazol-Aromaten auf die Ansamitocin-Grundstruktur anhand von Protonen-Abschirmungen durch Ringstromeffekte. Verglichen werden die Edukte **44** und **45** mit den daraus hervorgegangenen Konjugaten, wobei deutliche Abschirmungseffekte hervorgehoben sind.

4.1.6.4 Biologische Aktivitäten

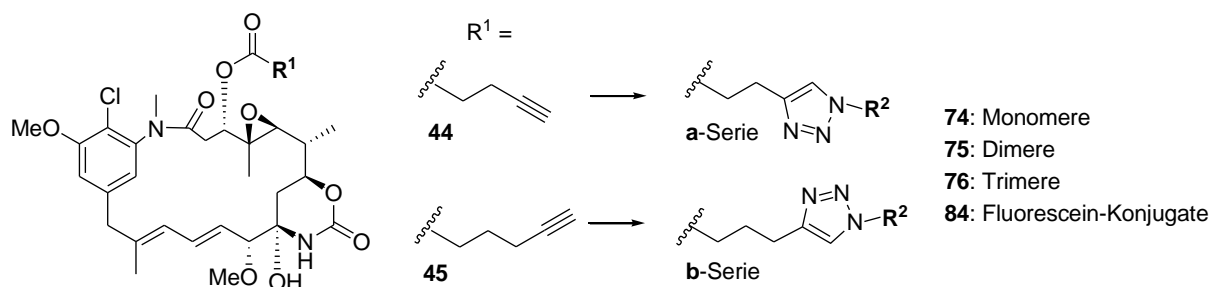
Die semisynthetisch erzeugten Ansamitocin-Derivate wurden wie bereits in vorherigen Kapiteln beschrieben von FLORENZ SASSE am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung⁵⁴ auf ihre biologische Aktivität untersucht (Tabelle 4).⁵⁵

Die Derivate **74a/b-76a/b** zeigten eine gegenüber den entsprechenden Edukten **44** und **45** moderat verringerte biologische Aktivität. Die geringe oder nicht nachgewiesene zytotoxische Aktivität der Fluorescein-Konjugate **84a/b** kann möglicherweise auf einen durch den polaren Fluorescein-Rest verringerten Übergang in die Zellen zurückgeführt werden.

Tabelle 4: IC₅₀-Werte [nM] der semisynthetisch erzeugten Ansamitocin-Derivate und der entsprechenden Edukte **44** und **45** im Vergleich zum natürlichen AP-3 **1c**.³⁶

Zelllinien: L-929 (Mausfibroblasten), U-937 (Leukämie), A-431 (Hautkarzinom), SK-OV-3 (Eierstockadenokarzinom), PC-3 (Prostataadenokarzinom), MCF-7 (Brustadenokarzinom), HUVEC (Nabelschnur-endothelzellen).

Ansamitocin-Derivate:



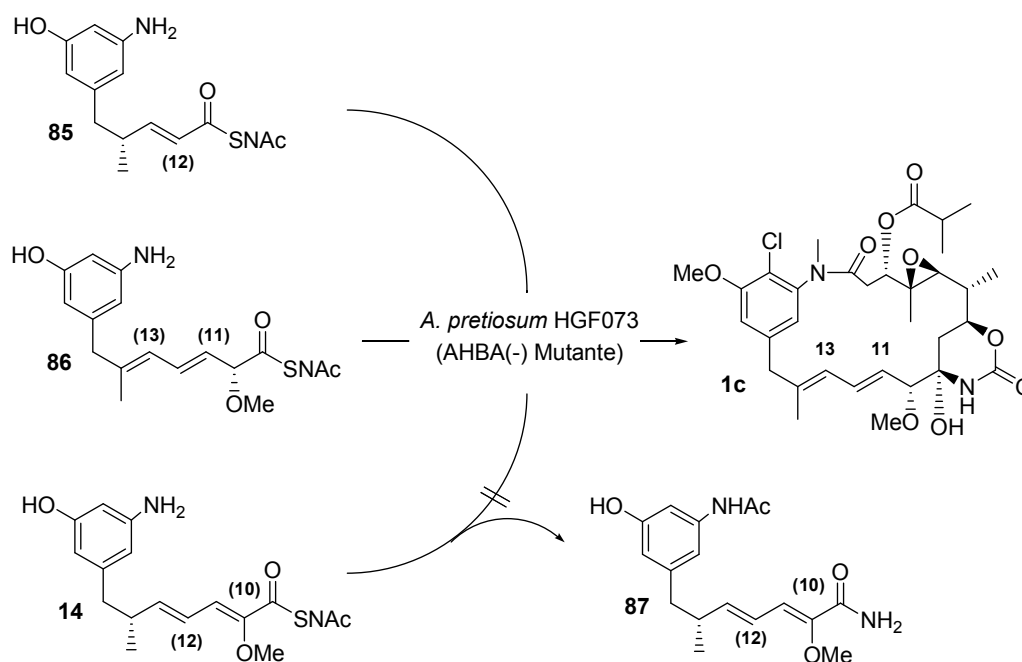
Zelllinie	AP-3	44	45	74a	74b	75a	75b	76a	76b	84a	84b
L-929	0.2	1.26	0.42	33	10.2	1.6	0.55	6.4	9.5	>330	>330
U-937	0.01	0.03	0.02	0.55	0.19	0.64	0.58	8.7	9.9	199	156
A-431	0.08	0.16	0.08	2.7	1.0	1.2	1.8	12.4	21	>330	>330
SK-OV-3	0.05	0.1	0.05	3.1	1.1	0.23	0.4	4.1	4.1	>330	>330
PC-3	0.06	0.19	0.35	5.3	1.6	0.66	6.6	50	72	>330	>330
MCF-7	-	0.13	0.06	0.81	1.5	0.95	1.8	15.1	17.1	>330	270
HUVEC	0.02	0.1	0.05	2.3	1.1	0.74	1.1	3.8	2.8	>330	>330

4.2 Studien zum Mechanismus der Dien-Migration

Unter den bereits einleitend beschriebenen Besonderheiten der Ansamitocine und ihrer Biosynthese in *Actinosynnema pretiosum* ist insbesondere das ungewöhnlich platzierte $\Delta^{11,13}$ -Diensystem hervorzuheben, das bereits im ersten freien Makrolaktamprodukt Proansamitocin **7** auftritt. Da im Rahmen der festgelegten Mechanismen der Polyketidbiosynthese dieses Strukturelement als $\Delta^{10,12}$ -Dien platziert werden würde, muss auf dem Weg zu Proansamitocin **7** eine Doppelbindungswanderung erfolgen.

4.2.1 Vorarbeiten

In Studien von FLORIAN TAFT waren auf synthetischem Weg hergestellte, potentielle Oligoketidvorläufer **14**, **85** und **86** in Komplementierungsexperimenten zu Kulturen der zur AHBA **6**-Biosynthese unfähigen Mutante *A. pretiosum* HGF073 supplementiert worden (Schema 44).³⁶



Schema 44: Ergebnisse der Komplementierungsexperimente mit *A. pretiosum* HGF073 unter Zugabe von Oligoketidvorläufern. Die Nummerierung der C-Atome entspricht der Nomenklatur des Endprodukts AP-3 **1c**.

Während das mit einer Doppelbindung in gewöhnlicher Position ausgestattete Triketid **85** zu AP-3 **1c** prozessiert wurde, konnte für das Tetraketid **14** mit $\Delta^{10,12}$ -analogem Diensystem nur eine Bildung des Detoxifizierungsprodukts **87** festgestellt werden. Im Gegensatz hierzu wurde das Tetraketid **86** mit isomerisiertem, unnatürlichen $\Delta^{11,13}$ -analogem Dien zu AP-3 **1c** umgesetzt. Zusammengefasst ließen diese Resultate den Schluss zu, dass die Doppelbindungsmigration während der Prozessierung des Tetraketids an Modul 3 stattfindet und nur das daraus resultierende Tetraketid (vgl. **86**) weiter umgesetzt werden kann. Zudem war anzunehmen, dass Tetraketid **14** kein Vorläufer der Dienwanderung ist, insofern zumindest von außen keine Einspeisung dieses möglichen Intermediats in die PKS-Prozessierung erfolgen konnte. Ausgehend von diesen Beobachtungen stellte sich die Frage nach möglichen Mechanismen der Doppelbindungswanderung.

4.2.2 Ergebnisse der Analysen

Prinzipiell weisen die in der Struktur von Polypeptid *AsmB* situierten Module 3 und 4 der Ansamitocin-PKS keine offensichtlichen, im Rahmen von Sequenzanalysen auffindbaren Besonderheiten wie redundante und scheinbar katalytisch inaktive Domänen auf.¹³⁷ Neben unbekannten Isomerasen, die mit der PKS interagieren müssten, lässt sich die mechanistische Grundlage der Dienwanderung vielmehr in der Prozessierung durch die vorhandenen Domänen des Moduls 3 vermuten. Die notwendige Triebkraft für diesen Vorgang wäre durch die vinyloge Eliminierung von Wasser durch die Dehydratase-Domäne DH3 realisierbar (Schema 45). Ein Sequenzvergleich von 856 bakteriellen PKS-Dehydratasedomänen der SMART-Datenbank¹³⁸ zeigte, dass DH3 eine zur gewöhnlichen α,β -syn-Dehydratisierung befähigte Domäne zu sein scheint (Motiv: PWLADH, DXXXXXXQ).^{139, 140} Aufgrund des geringen Konservierungsgrads der DH-Domänen untereinander und da zu diesem Zeitpunkt keine Kristallstrukturen von bakteriellen PKS-Dehydratasedomänen publiziert waren, konnte über die mechanistischen Grundlagen nur spekuliert werden. Hierfür boten sich zunächst

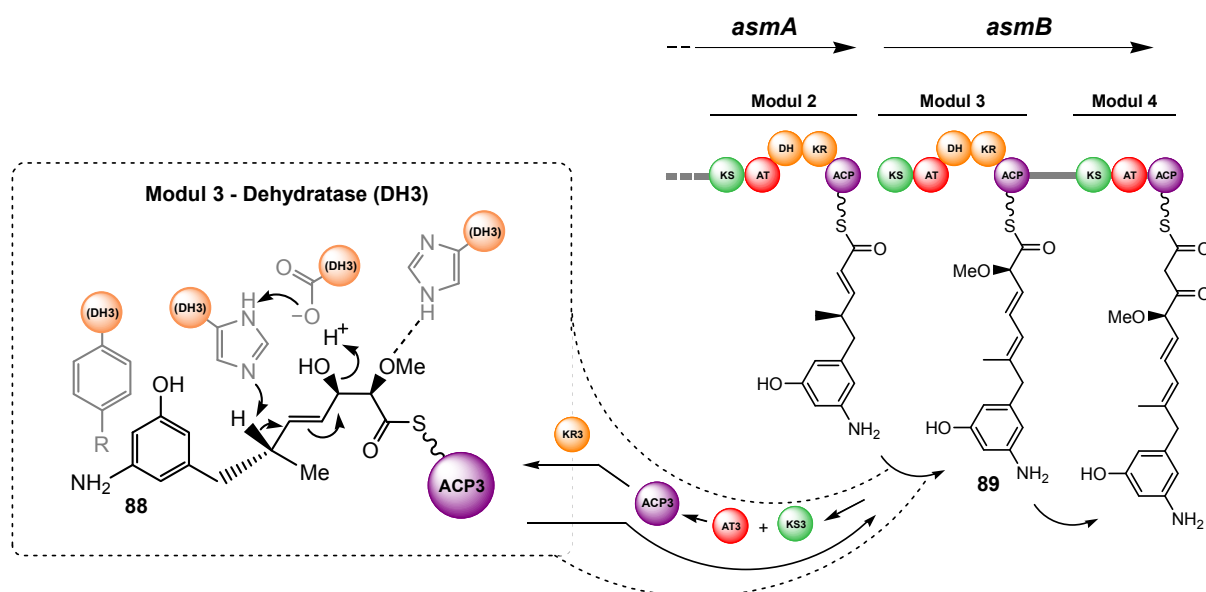
¹³⁷ Weitere Beispiele für postulierte Dienmigrations-Mechanismen: a) B. Kusebauch, B. Busch, K. Scherlach, M. Roth, C. Hertweck, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1460-1464; b) J. Moldenhauer, D. C. G. Götz, C. R. Albert, S. K. Bischof, K. Schneider, R. D. Süßmuth, M. Engeser, H. Gross, G. Bringmann, J. Piel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1465-1467.

¹³⁸ SMART = Simple Modular Architecture Research Tool: I. Letunic, R. R. Copley, B. Pils, S. Pinkert, J. Schultz, P. Bork, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 257-260.

¹³⁹ siehe Experimenteller Teil.

¹⁴⁰ a) J. Wu, T. J. Zaleski, C. Valenzano, C. Khosla, D. E. Cane, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17393-17404; b) S. Smith, S.-C. Tsai, *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 1041-1072.

stereoelektronische Überlegungen an, da für eine vinyloge 1,4-*syn*-Dehydratisierung grundsätzlich Proton und Abgangsgruppe in *syn*-periplanarer Anordnung vorliegen müssen.



Schema 45: Postulierter Mechanismus der vinylogen *syn*-Eliminierung durch DH3 im Kontext der PKS-Prozessierung. Beteiligte Aminosäureseitenketten der Dehydratase sind in grau dargestellt.

Die Konfiguration der Methyl- und Methoxy-substituierten Zentren war aus den beschriebenen Komplementierungsstudien bekannt. Die Vorhersage der Stereochemie des intermediär vorhandenen Alkohols gelang durch Sequenzanalyse der Ketoreduktase-Domäne KR3 (Motive: LDD, AXXXN = B-Typ KR).^{139, 141} In Anbetracht dieser stereochemischen Gegebenheiten kann eine vinyloge 1,4-*syn*-Dehydratisierung zu Tetraketid **89** nur erfolgen, wenn Intermediat **88** in der dargestellten Konformation fixiert ist.

Hierbei könnten Wechselwirkungen mit aromatischen Aminosäureseitenketten (F, Y) der DH3-Domäne eine Rolle spielen, wobei zudem eine α,β -*syn*-Dehydratisierung durch Koordination der Methoxygruppe mit dem katalytisch aktiven Histidin-Rest verhindert werden würde.^{140b, 142} Die vinyloge Deprotonierung müsste durch einen weiteren Histidin-Rest erfolgen. In Studien von CARROL *et al.* hatte eine *A. pretiosum*-Mutante unter Einbau von Malonyl-CoA anstatt des entsprechenden Methoxy-Bausteins nur Spuren entsprechender 10-Demethoxy-Ansamitocin-Derivate produziert.¹⁴³ In Anbetracht dieser Beobachtungen

¹⁴¹ a) P. Caffrey, *Chem. Biol.* **2003**, 10, 1060-1062; b) R. Reid, M. Piagentini, E. Rodriguez, G. Ashley, N. Viswanathan, J. Carney, D. V. Santi, R. Hutchinson, R. McDaniel, *Biochemistry* **2003**, 42, 72-79.

¹⁴² R. Castonguay, C. R. Valenzo, A. Y. Chen, A. Keatinge-Clay, C. Khosla, D. E. Cane, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 11598-11599.

¹⁴³ B. J. Carroll, S. J. Moss, L. Bai, Y. Kato, S. Toelzer, T.-W. Yu, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 4176-4177.

muss der Methoxy-Substituent als nicht essenziell, aber vermutlich als förderlich für eine vinyloge Dehydratisierung angesehen werden. Ähnlich Tetraketids **14** wären fehlerhaft α,β -dehydratisierte Intermediate nicht weiter zu Ansamitocinen prozessiert worden.

Die vorgestellten Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht,¹⁴⁴ wobei nach Publikation von Kristallstrukturen vergleichbarer PKS-Dehydratasemodule¹⁴⁵ mittlerweile eine genauere Analyse der *AsmDH3*-Sequenz vorgenommen werden kann. Auf Basis der publizierten Struktur der *EryDH4*-Domäne^{145a} der 6-Desoxyerythronolid B-PKS¹⁴⁶ gelang nach Erstellung eines ClustalW-Alignments¹⁴⁷ der Aminosäure-Sequenzen (Abbildung 20) die Erzeugung eines AsmDH3-Homologiemodells unter Verwendung des Programms SWISS-MODEL¹⁴⁸ (Abbildung 21). Hieraus geht hervor, dass die Hypothese der Beteiligung des DXXXXXQ-Motivs am katalytisch aktiven Zentrum korrigiert werden muss, da die aus der SMART-Datenbank entnommenen Sequenzen (*vide supra*) zu kurz bemessen waren und nicht die vollständigen Dehydratase-Domänen widerspiegeln.

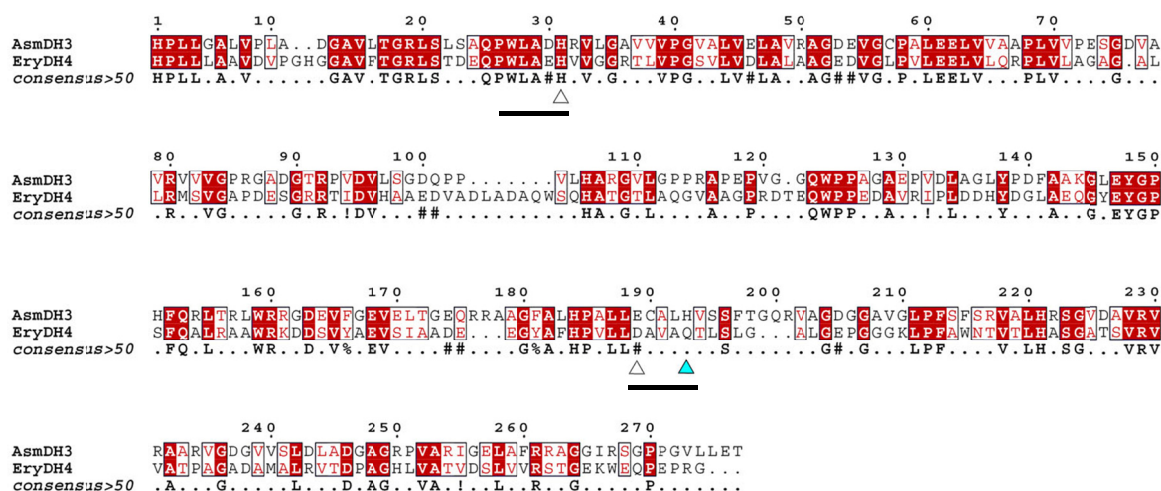


Abbildung 20: Zur Konstruktion des in Abbildung 21 dargestellten *AsmDH3*-Homologiemodells verwendetes Alignment. Im Text diskutierte Aminosäurereste sind durch farbige Pfeile hervorgehoben und entsprechende Motive unterstrichen.

¹⁴⁴ F. Taft, M. Brünjes, T. Knobloch, H. G. Floss, A. Kirschning, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3812-3813.

¹⁴⁵ a) A. Keatinge-Clay, *J. Mol. Biol.* **2008**, *384*, 941-953; b) D.L. Akey, J. R. Razelun, J. Tehranisa, D. H. Sherman, W. H. Gerwick, J. L. Smith, *Structure* **2010**, *18*, 94-105.

¹⁴⁶ 6-Desoxyerythronolid B ist das Aglykon des Antibiotikums Erythromycin.

¹⁴⁷ R. Chenna, H. Sugawara, T. Koike, R. Lopez, T. J. Gibson, D. G. Higgins, J. D. Thompson, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 3497-3500.

¹⁴⁸ T. Schwede, J. Kopp, N. Guex, M. C. Peitsch, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 3381-3385.

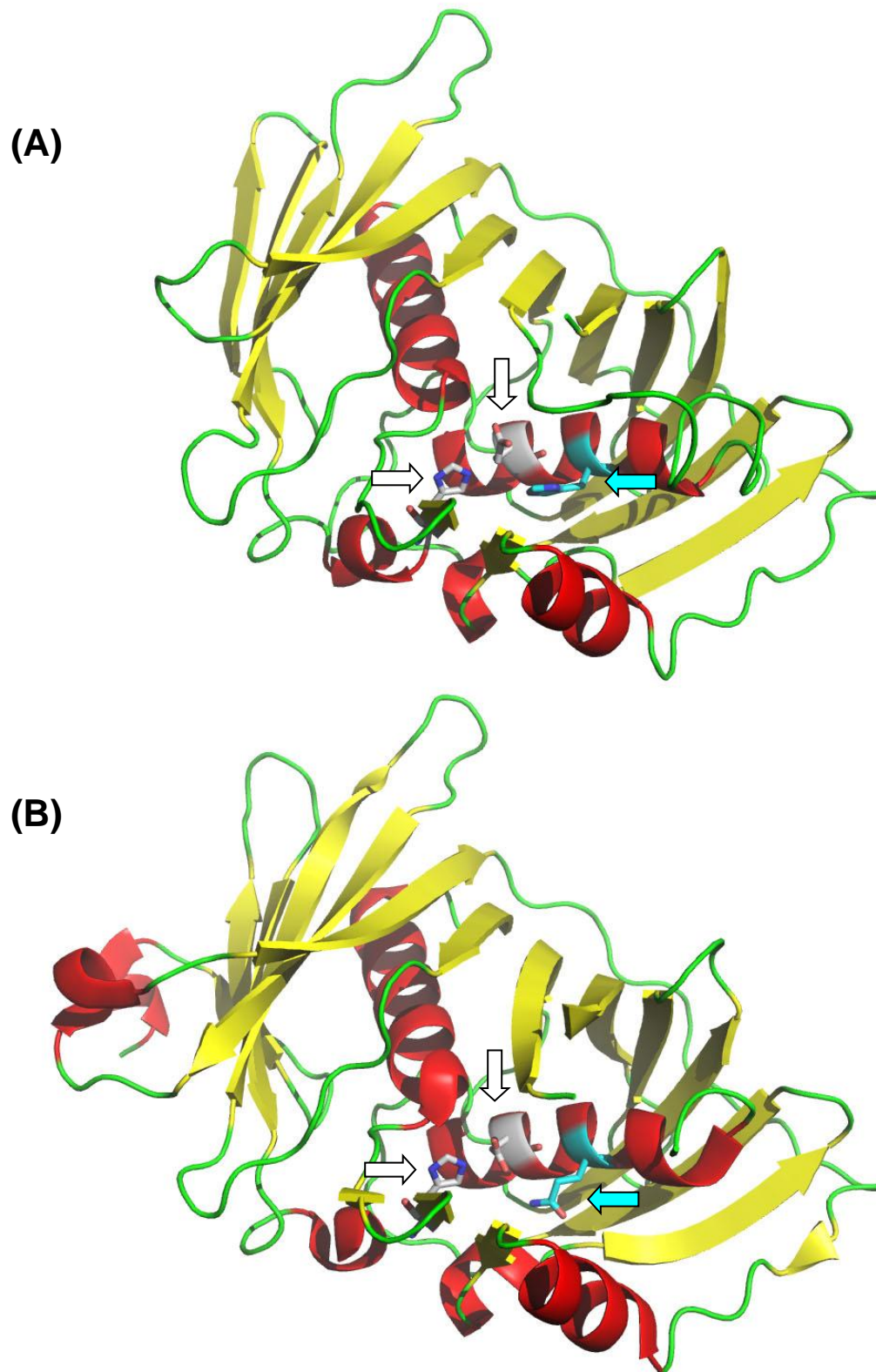


Abbildung 21: Homologiemodell der *AsmDH3* (A) auf Basis der publizierten Kristallstruktur der *EryDH4*-Domäne (B, PDB-ID: 3EL6). Im Text diskutierte Aminosäurereste sind farblich hervorgehoben. [Alignment-Position 31: H – weiß, 189: E/D – weiß, 193: H/Q – cyan] (vgl. Abbildung 20).

Während die EryDH4-Domäne in der Tat ein vergleichbares DXXXQ-Motiv aufweist, dessen Aspartat-Rest mit dem Histidin des ebenfalls bei AsmDH3 vorhandenen PWLA-[DE]-H-Motivs das katalytische Zentrum bildet, so besitzt die AsmDH3 an dieser Stelle ein EXXXH-Motiv. Die konservative, formale (Asp→Glu)-Ersetzung kann hierbei nicht überraschen, wobei auch die entsprechende (Gln→His)-Ersetzung bei anderen DH-Domänen auftritt. Im Zusammenhang mit den Besonderheiten der Ansamitocin-Biosynthese ist jedoch anzunehmen, dass dieser im Modell nahe des katalytischen Zentrums platzierte Histidin-Rest die zuvor diskutierte, vinylog deprotonierende Base darstellt. Ein Beweis könnte allerdings insbesondere angesichts der komplexen homodimerischen Struktur von Dehydratasemodulen in Polyketidsynthasen^{145a} nur durch zukünftige Mutationsstudien erfolgen, wofür sich beispielsweise eine (His→Gln)-Ersetzung anbieten würde.

5 Zusammenfassung und Ausblick

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten insgesamt 39 Ansamitocin-Derivate durch mutasynthetische und semisynthetische Ansätze erzeugt, charakterisiert und einer Evaluierung ihrer biologischen Aktivität zugeführt werden.

Hierbei konnte einerseits durch Fermentation der Mutanten *A. pretiosum* Δasm12/21 und HGF052 ein Zugang zu ihren bekannten Ansamitocinvorläufer-Produkten Proansamitocin **7**, beziehungsweise *N*-Demethyl-4,5-deepoxymaytansinol **65** etabliert werden. Andererseits konnten für diese Stämme erstmals weitere Produkte ihrer Ansamitocin-Biosynthese isoliert werden. In Verbindung mit mutasynthetisch generierten Intermediaten der Ansamitocin-Biosynthese und der erzeugten Bibliothek von möglichen Acyl-Cosubstraten der Acyltransferase *Asm19* besteht nun eine exzellente Grundlage für die Untersuchung der chemoenzymatischen Synthese von hochaktiven Ansamitocinen in kontrollierbaren *in vitro*-Systemen.

Unter Verwendung der in der Biosynthese des PKS-Initiationsbausteins AHBA blockierten Mutante *A. pretiosum* HGF073 konnte die *in vivo*-Prozessierung von vier verschiedenen, in Position 5 substituierten 3-Aminobenzoesäuren zu Ansamitocin-Derivaten gezeigt werden. Während dies eindeutig die Flexibilität des basalen Systems bestehend aus PKS und der vermuteten Ansamycin-Amidsynthase *Asm9* darlegt, wurde eine stärkere Diskriminierung der Mutaprodukt-Intermediate im Rahmen der post-PKS-Biosynthese beobachtet. Erstmals konnten aus einem einzigen mutasynthetischen Ansatz mit *A. pretiosum* HGF073 bis zu sieben Substanzen isoliert werden. Das auftretende Spektrum an Zwischenstufen erlaubt hierbei einerseits einen Einblick in die Substrattoleranzen der komplexen post-PKS-Kaskade, andererseits bieten sich die Intermediate für eingehende SAR-Studien und als Substrate für weitere *in vitro*-Charakterisierungen der post-PKS-Enzyme an. Zudem konnte das etablierte Verfahren für diese Mutasynthesen durch die Entwicklung eines Systems zur kontinuierlichen Substratzugabe verbessert werden. Weiterhin wurde mit der Isolierung und Charakterisierung von 7-desoxygenierten Ansamitocin-Derivaten und ihren C-9-reduzierten Folgeprodukten ein neuer Typ der post-PKS-Modifizierung gefunden.

Erstmalig konnte eine Vorläufer-dirigierte Biosynthese mit unnatürlichen, kurzkettigen Azido- und Alkincarbonsäuren gezeigt werden, die außerdem zu isolierbaren Ausbeuten führte. Dies

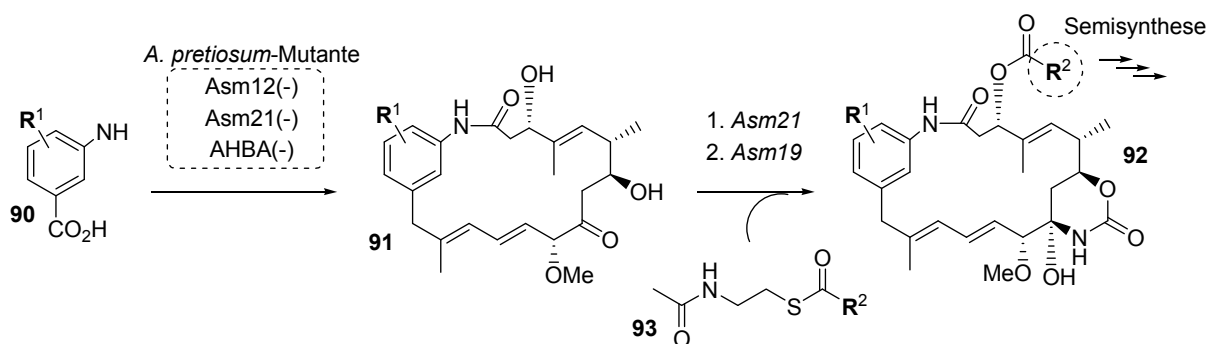
zeigt die Substratflexibilität der Acyltransferase *Asm19* und das damit einher gehende Potential dieses Enzyms für eine *in vitro*-Anwendung. Die Carbonsäure-Supplementierung konnte auch mit einem mutasynthetischen Ansatz unter Zufütterung einer AHBA-analogen Aminobenzoesäure kombiniert werden, wodurch in zwei Strukturelementen veränderte Derivate erhalten wurden. Neben der Verwendung des Systems zur kontinuierlichen Substratzugabe erwies sich vor allem der Zusatz von Kokosnusswasser als entscheidend für eine erfolgreiche *in vivo*-Erzeugung von Ansamitocin-Derivaten mit unnatürlichen Esterseitenketten. Das komplexe Additiv Kokosnusswasser ist vor allem durch den hohen Gehalt an Phytohormonen charakterisiert, wobei in weiteren Studien in der Tat ein stimulierender Einfluss von bestimmten Substanzen mit Phytohormonaktivität auf die Ansamitocin-Produktion durch *A. pretiosum* nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz zu vergleichbaren Studien mit Actinomyceten traten die Effekte schon bei Zugabe der Substanzen in Geringstkonzentrationen (nM-fM) auf.

Die Anwendung der Kupfer-katalysierten Alkin-Azid-Zykloaddition (CuAAC) konnte unter Verwendung der fermentativ erzeugten Ansamitocin-Derivate mit unnatürlichen Alkincarbonsäure-Esterseitenketten erstmalig für Strukturen des Ansamitocin-Typs gezeigt werden. Hierbei wurden sechs oligomere Ansamitocin-Konjugate, sowie zwei mit dem Fluorophor Fluorescein markierte Ansamitocin-Derivate erzeugt.

In Kombination mit den von FLORIAN TAFT durchgeführten experimentellen Studien³⁶ konnte auf Basis von Sequenzanalysen der *AsmPKS* ein Mechanismus für die Installierung des ungewöhnlichen $\Delta^{11,13}$ -Diensystems vorgeschlagen werden. Die These einer vinylogenen *syn*-Dehydratisierung durch die Dehydratase des PKS-Moduls 3 bietet eine fundierte Erklärung für einen der letzten ungewissen Schritte der Ansamitocin-Biosynthese.

5.2 Ausblick

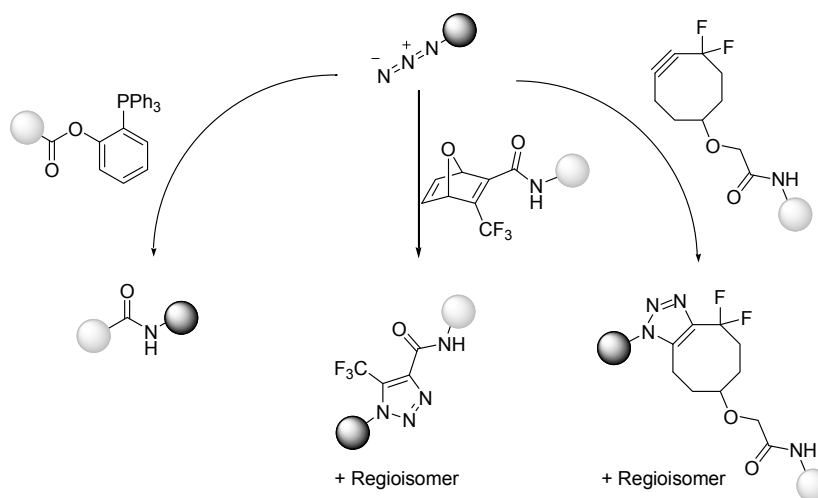
Während die Fermentation von *A. pretiosum*-Mutanten durchaus zur Erzeugung von Material zur weiteren semisynthetischen Derivatisierung genutzt werden kann, so gehen die durch post-PKS-Modifizierungen auftretenden Produktspektren mit einer Reduzierung der Ausbeute der Zielverbindung einher und erfordern einen hohen Aufwand bei ihrer Isolierung. Insofern sollte eine Entkopplung der basalen Biosynthese von Proansamitocin-Derivaten **90** und ihrer Modifizierung durch post-PKS-Enzyme verfolgt werden. Eine Einführung des AHBA(-)-Phänotyps ähnlich des Stamms *A. pretiosum* HGF073 in die Mutante *A. pretiosum* Δ asm12/21 würde ein mutasynthetisches Werkzeug erzeugen, bei dessen Verwendung nur eine Hauptkomponente zu erwarten wäre. Die durch Wahl des zugefütterten Aromaten **91** im arylischen Strukturelement veränderten Proansamitocin-Derivate könnten dann *in vitro* durch die Carbamoyltransferase *Asm21* und die Acyltransferase *Asm19* zu biologisch aktiven Verbindungen **92** umgesetzt werden (Schema 46). Durch geeignete Wahl des hinzugegebenen Esterseitenkettenvorläufers **93** wären die resultierenden Derivate unter standardisierten Semisynthesebedingungen und unabhängig von den Veränderungen der aromatischen Einheit beispielsweise zu Tumor-gerichteten Konjugaten umsetzbar.



Schema 46: Mutasynthese von Proansamitocin-Derivaten mit anschließender enzymatischer und semisynthetischer Modifizierung.

Neben der CuAAC sollte hierbei auch die kupferfreie Variante ausgehend von Azido-Ansamitocin-Derivaten untersucht werden (Schema 47). Obwohl die Ringspannungs-aktivierten Alkin-Derivate prinzipiell keine Regioselektivität bei der Zykladdition zeigen, wäre angesichts der komplexen Ansamitocin-Struktur dennoch eine Substrat-kontrollierte

Regioselektivität beim Aufbau des Konjugats zu erwarten.¹⁴⁹ Alternativ könnte auf Basis von Azido-Ansamitocinderivaten auch ein Aufbau von Konjugaten mittels der hochselektiven STAUDINGER-Ligation erfolgen.¹⁵⁰



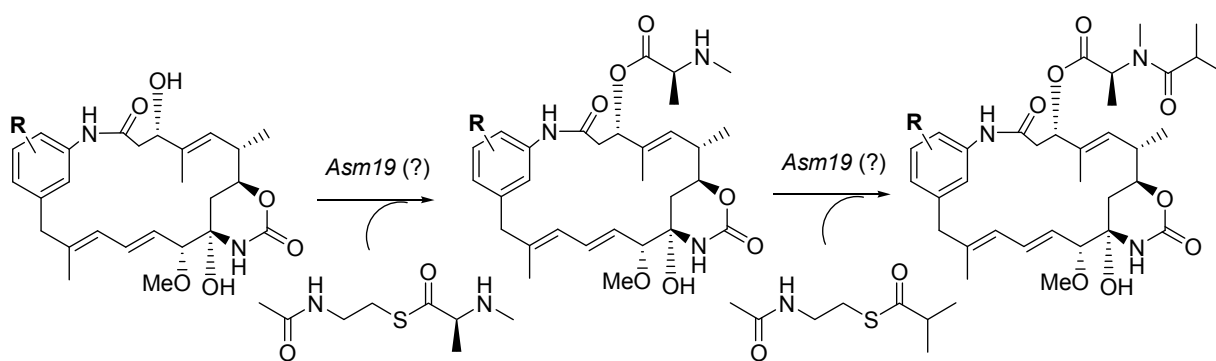
Schema 47: Möglichkeiten zur Kupfer-freien Derivatisierung von Azido-Ansamitocin-Derivaten mittels STAUDINGER-Ligation (links) oder Ringspannungs-geförderter Zykladdition (Mitte und rechts).

Wie bereits im Rahmen von Kapitel 4.1.3 diskutiert wurde, wäre mit den isolierten Enzymen *Asm21* und *Asm19* zudem eine Umsetzung mit den im Rahmen dieser Arbeit isolierten Ansamitocin-Derivaten zu überprüfen. Neben der Frage, ob am Benzylalkohol carbamoylierte Ansamitocin-Derivate Zwischenstufen oder Abbruchprodukte der post-PKS-Sequenz darstellen, wäre vor allem von Interesse, ob neben der gewöhnlichen 7-*O*-Carbamoylierung auch alle weiteren Carbinolamid-Gruppen der isolierten Derivate auf die Aktivität des Enzyms *Asm21* zurückzuführen sind.

Neben weiteren Studien zum Einfluss von Phytohormonen auf *A. pretiosum*-Kulturen im skalierten Schüttelkulturenmaßstab, sollte vor allem die Herkunft der „pflanzlichen“, maytansinoiden Esterseitenketten untersucht werden. Abgesehen von Versuchen zur Umsetzung der vollständigen Seitenkettenvorläufer mit dem isolierten Enzym *Asm19*, sollte auch ein sukzessiver Aufbau unter alleiniger oder kooperativer Beteiligung dieser Acyltransferase in Betracht gezogen werden (Schema 48).

¹⁴⁹ a) J. M. Baskin, J. A. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A. Miller, A. Lo, J. A. Codelli, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 16793-16797; b) S. S. van Berkel, A. T. J. Dirks, M. F. Debets, F. L. van Delft, J. J. L. M. Cornelissen, R. J. M. Nolte, F. P. J. T. Rutjes, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1504-1508. c) S. S. van Berkel, A. J. Dirks, S. A. Meeuwissen, D. L. L. Pinggen, O. C. Boerman, P. Laverman, F. L. van Delft, J. J. L. M. Cornelissen, F. P. J. T. Rutjes, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1805-1815.

¹⁵⁰ a) F. L. Lin, H. M. Hoyt, H. van Halbeek, R. G. Bergman, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2686-2695; b) M. Köhn, R. Breinbauer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3106-3116; c) E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, *287*, 2007-2010; d) H. Staudinger, J. Meyer, *Helv. Chim. Acta* **1919**, *2*, 635-646.



Schema 48: Möglicher sukzessiver Aufbau einer maytansinoiden Seitenkette durch die Acyltransferase *Asm19*.

Auf Basis des in Kapitel 4.2 vorgestellten Homologiemodells der *AsmDH3* kann die These zum Mechanismus der Doppelbindungsumlagerung durch den mutativen Austausch vermuteter Schlüsselaminosäuren unterstützt werden. Insbesondere die schrittweise Überführung des EXXXH-Motivs des vermuteten katalytischen Zentrums in ein homologes DXXXQ-Muster sollte bei entsprechenden *A. pretiosum*-Mutanten die Unterbindung der Dien-Migration und die Einstellung der Ansamitocin-Biosynthese zur Folge haben.

Während die Ansamitocin-Biosynthese in *A. pretiosum* ihre Flexibilität und Nutzbarkeit zur Darstellung hochaktiver Ansamitocin-Derivate bereits durch zahlreiche *in vivo*-Studien gezeigt hat, sind diese Ergebnisse stets als Kompromiss dieses komplexen Systems zu sehen. In naher Zukunft werden *in vitro*-Studien zu den isolierten Enzymen *Asm19* und *Asm21*, sowie zur vermuteten Ansamycin-Amidsynthese *Asm9* sicherlich tiefere Einsichten in das Potential und die Nutzbarkeit dieser Biokatalysatoren zu synthetischen Zwecken bieten.

6 Experimenteller Teil

6.1 Allgemeine Hinweise zu chemisch-synthetischen Arbeiten

Gerätschaften

Alle Reaktionen mit luft- oder feuchtigkeitsempfindlichen Reagenzien wurden unter Inertgasatmosphäre (Stickstoff oder Argon) durchgeführt. Die entsprechenden Glasgeräte wurden vor der Verwendung im Vakuum ausgeheizt, Spritzen und Kanülen wurden bei 90 °C getrocknet und mit Inertgas gespült.

Lösungsmittel und Reagenzien

Lösungsmittel für den Einsatz in feuchtigkeitsempfindlichen Reaktionen wurden nach Standardverfahren¹⁵¹ getrocknet und unter Inertgasatmosphäre aufbewahrt bzw. frisch destilliert eingesetzt: Diethylether (Et₂O) und Tetrahydrofuran (THF) wurden über Natriumdraht unter Rückfluss mit Benzophenon als Indikator gekocht, Dichlormethan (CH₂Cl₂) wurde über Calciumhydrid unter Rückfluss gekocht. Alle weiteren absoluten Lösungsmittel wurden käuflich erworben (FLUKA, ACROS). Bei sauerstoffsensiblen Reaktionen wurde das Lösungsmittel vor Gebrauch durch Spülen mit Inertgas oder nach Ausfrieren im Vakuum (*freeze-pump-thaw degassing*) entgast. Alle Reagenzien, deren Herstellung nicht angegeben ist, stammen von den Firmen ACROS, ALDRICH, FLUKA und ABCR. Bei wässrigen Lösungen handelt es sich um gesättigte Lösungen, sofern nicht anders angegeben.

Chromatographie

Analytische Dünnschichtchromatographie wurden mit Kieselgel beschichteten Aluminiumfolien vom Typ 60 F₂₅₄ der Firma MERCK durchgeführt. Die Indikation erfolgte durch Fluoreszenzdetektion ($\lambda = 254$ nm) und durch unterschiedliche Färbereagenzien¹⁵² (Anisaldehyd-, Kaliumpermanganat- oder Ninhydrin-Tauchreagenz) mit anschließender Wärmebehandlung.

¹⁵¹ W. L. F. Armarego, D. D. Perrin, *Purification of Laboratory Chemicals*, 4th Ed., Butterworth and Heinemann, Oxford **1996**.

¹⁵² J. Leonhard, B. Lygo, G. Procter, *Praxis in der organischen Chemie*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, **1996**.

Säulenchromatographie („Flash“-Chromatographie; Abkzg.: SiO₂) wurde mit Kieselgel der Firma MACHERY-NAGEL (Korngröße 40-63 µm) bei leichtem Überdruck durchgeführt. Die eingesetzten Lösungsmittel wurden einfach destilliert, das Eluentenverhältnis ist in den entsprechenden Versuchsvorschriften angegeben.

Größenausschluss-Chromatographie wurde mit Sephadex[®] LH-20 (Abkzg.: Sephadex LH-20) als stationärer Phase (Abmessungen: 500 mm * ø 20 mm) und unter Verwendung von einfach destilliertem Methanol als Eluenten durchgeführt.

Für *reversed phase*-HPLC-Anwendungen wurde grundsätzlich membran-filtrierte und danach bidestillierte Wasser, sowie kommerziell verfügbare HPLC-Qualität-Lösungsmittel (Methanol, Abkzg. MeOH oder Acetonitril, Abkzg. MeCN) verwendet, die zuvor im Ultraschallbad oder mittels Durchleitung von Helium entgast wurden. Gegebenfalls verwendete Additive zu diesen mobilen Phasen (Trifluoressigsäure, Abkzg. TFA oder Ameisensäure, Abkzg. FA) sind in den entsprechenden Elutionsmethoden angegeben.

Analytische HPLC wurde an einer HEWLETT PACKARD 1050 series HPLC-Anlage mit UV-Detektion ($\lambda = 248$ nm) und Säulenofen ($T = 40$ °C) durchgeführt. Die Datenaufnahme und Analyse erfolgte bevorzugt Computer-gestützt (Software DATALYS Azur 4.6). Es wurden bevorzugt folgende stationäre Phasen verwendet: **(C18-A)** Säule des LiChroCART[®]-Systems der Firma MERCK: LiChrospher[®] 100 RP-18 5 µm, 125 mm * ø 4 mm, mit entsprechender Vorsäulenkartusche, 4 mm * ø 4 mm; **(CN-A)** Säule des EC-Systems der Firma MACHERY-NAGEL: Nucleodur[®] 100 CN-RP 5 µm, 125 mm * ø 4 mm, mit CC Nucleosil[®] 100 CN-RP 5 µm-Vorsäulenkartusche, 8 mm * ø 4 mm.

Präparative HPLC wurde an einer MERCK HITACHI LaChrom HPLC-Anlage (Pumpe L-7150, Interface D-7000, Dioden-Array Detektor L-7450 { $\lambda = 220-400$ nm}) durchgeführt. Hierfür kamen folgende stationäre Phasen zur Anwendung: **(C18-P_{IA})** TRENTec Reprosil-Pur 120 C18 AQ 5 µm, 250 mm * ø 25 mm, mit entsprechender Vorsäulenkartusche, 30 mm * ø 20 mm; **(C18-SP)** TRENTec Reprosil-Pur 120 C18 AQ 5 µm, 250 mm * ø 8 mm, entsprechender Vorsäulenkartusche, 40 mm * ø 8 mm; **(CN-SP)** TRENTec Reprosil 100 CN 5 µm, 250 mm * ø 8 mm, entsprechender Vorsäulenkartusche, 40 mm * ø 8 mm.

Alternativ wurde präparative HPLC an einer VARIAN HPLC-Anlage (Pumpen Prepstar Model 218, Variabler Wellenlängendetektor Prostar { $\lambda = 248$ nm}) mit paralleler Massendetektion (MICROMASS Typ ZMD ESI-Quad-Spektrometer) unter Verwendung der stationären Phase C18-P_{IA} durchgeführt (verwendete Abkzg. **C18-P_{IB}**).

Die verwendeten Elutionsprogramme und Retentionszeiten (t_R) sind in den jeweiligen Versuchsvorschriften angegeben.

NMR-Spektroskopie

Die Aufnahme von ^1H -NMR Spektren erfolgte mit den Geräten DPX-200 (200 MHz), Avance-400, DPX-400 (400 MHz) und DRX-500 (500 MHz) der Firma BRUKER bei Raumtemperatur. Das verwendete Solvens ist jeweils angegeben, kalibriert wurde auf das durch den Restprotonengehalt des Lösungsmittels verursachte Signal.¹⁵³ Die Angabe der chemischen Verschiebung δ erfolgt in ppm, die der Kopplungskonstanten J in Hertz (Hz), die Multiplizitäten werden wie folgt abgekürzt: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, quint = Quintett, m = Multipllett. Vor der Multiplizitätsangabe stehende Bezeichnungen: pseudo, b = breites Signal.

^{13}C -NMR Spektren wurden mit den Geräten Avance-400, DPX-400 (100 MHz) und DRX-500 (125 MHz) der Firma BRUKER aufgenommen. Das verwendete Solvens ist jeweils angegeben, kalibriert wurde auf das vom Lösungsmittel verursachte Signal.¹⁵³ Die Angabe der chemischen Verschiebung δ erfolgt in ppm, die angegebenen Multiplizitäten entsprechen denen nicht entkoppelter Spektren: s = Singulett (entspricht quartärem Kohlenstoff), d = Dublett (tertiärer Kohlenstoff), t = Triplett (sekundärer Kohlenstoff), q = Quartett (primärer Kohlenstoff). Die Anzahl der an den jeweiligen Kernen α -ständigen Wasserstoffatome wurde nach der DEPT 90 / DEPT 135-Methode oder durch phasen-sensitive HSQC-Experimente bestimmt. Sofern nötig wurden für eine vollständige Interpretation ^1H - ^1H -Korrelationsspektren (COSY), ^1H - ^{13}C -Korrelationsspektren (HMQC, HMBC, HSQC) oder nOe-Experimente durchgeführt. Bei Kopplungen mit anderen NMR-aktiven Kernen (^{19}F) sind entsprechende Multiplizitäten (*vide supra*) und die Kopplungskonstanten $J_{\text{F-C}}$ (in Hz) angegeben.

Massenspektrometrie

Hochaufgelöste Massenspektren (HRMS) wurden alternativ mit folgenden Geräten aufgenommen: MICROMASS VG Autospec-Typ-Spektrometer (EI, *electron impact ionisation*) bei 75 eV; MICROMASS LCT-Typ-Gerät (ESI, *electro-spray ionisation*) mit einer Lock-Spray-Dual-Ionenquelle in Verbindung mit einem WATERS Alliance 2695 LC-System; MICROMASS Typ Q-TOF Premier-Spektrometer (ESI-Modus) in Verbindung mit einem Waters Acquity UPLC-System mit WATERS Acquity UPLC BEH C18 1.7 μm (SN 01473711315545)-Säule (Eluent A: Wasser + 0.1 % {v/v} FA, Eluent B: MeCN oder MeOH {entsprechend angegeben} + 0.1 % {v/v} FA; Flussrate = 0.4 mL/min; Gradient: {t [min]/B [%]}: {0/5} {2.5/95} {6.5/95} {6.6/5} {8/5}; Retentionszeiten { t_{R} } sind in den entsprechenden Versuchs-

¹⁵³ H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 7512-7515.

vorschriften angegeben). Massensignale der Ionen (m/z) sind als berechnete und gefundene Masse in atomaren Masseneinheiten angegeben. MS/MS-Fragmentierungsexperimente wurden mit dem Typ Q-TOF-Gerät unter Verwendung von Argon als Kollisionsgas durchgeführt, wobei bevorzugt ein Kollisionsenergiegradient von 15-45 eV (für $[M+H]^+$ -Mutterionen) oder 30-45 eV (für $[M+Na]^+$ -Mutterionen) zur Erzeugung von Tochterionen eingesetzt wurde.

Schmelzpunkte

Die Schmelzpunktbestimmung erfolgte unter Verwendung von Geräten des Typs Optimelt der Firma SRS oder des Typs IA-9200 der Firma ELECTROTHERMAL. Die ermittelten Schmelzpunkte sind als unkorrigierte Werte angegeben.

6.2 Allgemeine Hinweise zur Arbeit mit *A. pretiosum*-Stämmen

Die verwendeten Gerätschaften und Nährmedien wurden durch Autoklavieren behandelt. Hitzeempfindliche Materialien wurden durch Isopropanol- oder Ethanoleinwirkung (70 % {v/v}) sterilisiert, während nicht autoklavierbare Zusätze in Lösung (Substanzen zur Verfütterung oder weitere Medienadditive) vor Verwendung einer Sterilfiltration unterzogen wurden.

Stämme

Zur Anwendung kamen folgende Stämme, die von H. G. FLOSS bzw. PETER SPITELLER bereitgestellt, und üblicherweise als Sporensuspension in 40 % (v/v) Glycerol/Wasser bei -80 °C gelagert wurden:

- *A. pretiosum* Δasm12/21³³
 - Phänotyp: Asm12(-), Asm21(-); „Proansamitocin 7-Mutante“
- *A. pretiosum* HGF073²⁵
 - Phänotyp: AHBA(-); Replikat des publizierten Stamms HGF056
- *A. pretiosum* HGF052²⁵
 - Phänotyp: Asm19(-); „N-Demethyl-4,5-deepoxy-maytansinol 65-Mutante“

Nährmedien

Die Kultivierungsmedien wurden mit membran-filtrierte Wasser angesetzt: YMG-Medium – 10 g/L Malzextrakt (SIGMA), 4 g/L Hefeextrakt (BACTO), 4 g/L D(+)-Glukose*H₂O; YMG-Agar – YMG-Medium plus 22 g/L Agar (BACTO); K-Medium⁴¹ Grundzusammensetzung (finale Anfangskonzentration in Hauptkulturen entspricht aufgrund von Verdünnungseffekten 5/6 der angegebenen Werte) – 60 g/L Dextrin aus Maisstärke (FLUKA), 30 g/L D(+)-Maltose*H₂O (FLUKA), 5.25 g/L *cottonseed flour* Baumwollsaatmehl (PROFLO), 5 g/L CaCO₃, 4.5 g/L Hefeextrakt (BACTO), 300 mg/L K₂HPO₄ (FLUKA, TraceSelect), 2 mg/L FeSO₄*7H₂O. K-Medium, üblicher Zusatz – separat autoklaviert und nachträglich hinzugefügt: 3 g/L L-Valin (finale Anfangskonzentration in Hauptkulturen, aus einer 3 % (w/v) Lösung).

Kultivierung

Die Kultivierung der Stämme auf Agarmedium erfolgte in einem Inkubator der Firma HERAEUS bei 30 °C. Die Inkubation von Schüttelkulturen wurde in einem Innova 4900 Multiebenen-Rotationsschüttelschrank der Firma NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC bei 29 °C und 200 rpm vorgenommen. Für Schüttelkulturen wurden mit zusätzlichem Stahlfedereinsatz versehene 250 mL Erlenmeyerkolben (bis 50 mL Fermentationsvolumen) oder 500 mL Erlenmeyerkolben (90-150 mL Fermentationsvolumen) verwendet.

Allgemeines Fermentationsprotokoll

Ausgehend von einer Sporensuspension (*vide supra*) wurden YMG-Agarplatten inokuliert und für 4 Tage inkubiert. 5-8 gut sporulierte Kolonien wurden daraufhin in ein mit 1 mL sterilem Wasser und sterilen Glassperlen (bis zu halben Höhe befüllt; ø 2 mm, zuvor mit verdünnter Salzsäure gewaschen) befülltes 1.5 mL Reaktionsgefäß überführt. Nach Vortex-Durchmischung wurde die Suspension zur Inokulation von Vorkulturen in 250 mL Erlenmeyerkolben mit Bodenschikanen und YMG-Medium genutzt (50 mL pro Kolben). Diese wurden für zwei Tage geschüttelt und zum Animpfen der Hauptkulturen verwendet (1/15-Verdünnung). Hauptkulturen wurden in K-Medium mit Zusätzen durchgeführt (z.B. 45 mL Fermentationsvolumen; 42 mL K-Medium mit L-Valin-Zusatz + 3 mL Vorkultur + ein Tropfen SAG 471-Antischaummittel {GE BAYER SILICONES}), die für 7-10 Tage geschüttelt wurden.

Analytik

Für eine Untersuchung des Fermentationsüberstands wurde eine Probe der Kulturbrühe (200 µL) mit einem Volumen Ethanol gemischt, zentrifugiert (20800*g, 3 min, 4 °C) und der klare Überstand einer UPLC-ESI(+)-MS- (bevorzugtes Injektionsvolumen 5-10 µL) oder analytischen *reversed phase*-HPLC-UV-Analyse (bevorzugtes Injektionsvolumen 40 µL) unterzogen. Für letztere Analytik wurden folgende Elutionsprogramme verwendet: **(A)** Eluent A: Wasser + 0.1 % {v/v} TFA, Eluent B: MeCN + 0.1 % {v/v} TFA; Flussrate = 1 mL/min; Gradient: {t [min]/B [%]}: {0/5} {6/35} {18/60} {18.01/95} {22/95} {22.01/5} {27/5}; **(B)** Eluent A: Wasser + 0.1 % {v/v} TFA, Eluent B: MeCN + 0.1 % {v/v} TFA; Flussrate = 1 mL/min; Gradient: {t [min]/B [%]}: {0/5} {9/50} {9.01/95} {12/95} {12.01/5} {15/5}; **(C)** Eluent A: Wasser + 0.1 % {v/v} TFA, Eluent B: MeCN + 0.1 % {v/v} TFA; Flussrate = 1 mL/min; Gradient: {t [min]/B [%]}: {0/5} {6/25} {18/40} {18.01/95} {18.01/95} {22/95} {22.01/5} {25/5}; **(D)** Eluent A: Wasser + 0.1 % {v/v} TFA, Eluent B:

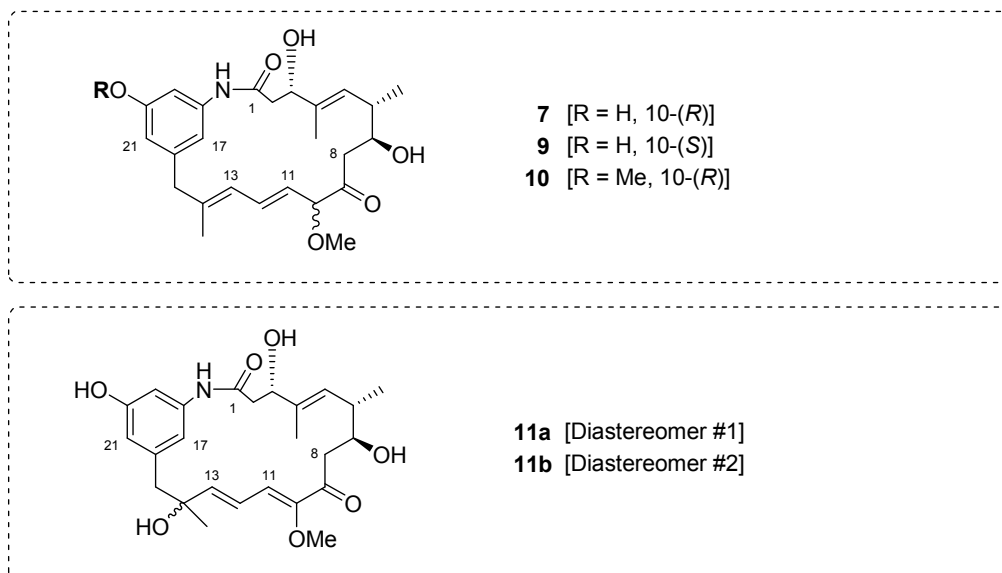
MeOH + 0.1 % {v/v} TFA; Flussrate = 2 mL/min; Gradient: {t [min]/B [%]}: {0/10} {4/65} {6.99/65} {7/100} {9/100} {9.01/10} {12/10}. Retentionszeiten {t_R} sind in den entsprechenden Versuchsvorschriften angegeben

Aufarbeitung

Zur Isolierung von Ansamitocin-Derivaten wurde die Fermentationsbrühe üblicherweise dreimal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit NaCl-Lösung gewaschen. Nach Entfernung des Lösungsmittels *in vacuo* wurde das erhaltene Rohprodukt chromatographischen Reinigungsschritten unterzogen („Flash“-Chromatographie, Größenausschluss-Chromatographie, *reversed phase*-HPLC) die in den entsprechenden Versuchsvorschriften beschrieben werden. Wässrige Rückstände der extraktiven Aufarbeitung wurden durch Zusatz von NaOH-Plättchen inaktiviert.

6.3 Mutasyntesen aus Kapitel 4.1.1

Proansamitocin-Derivate 7, 9, 10, 11a, 11b



Die Fermentation von *A. pretiosum* Δasm12/21 erfolgte nach dem unter 6.2 beschriebenen Fermentationsprotokoll, wobei zusätzlich Nylonnetze (handelsübliche Nylonstrumpfhosen) vor Autoklavierung der Fermentationskolben über die Stahlfedereinsätze gespannt wurden. Der Fermentationsüberstand wurde der allgemeinen extraktiven Aufarbeitung unterzogen. Die auf den Nylonnetzen haftende Biomasse wurde mit MeOH extrahiert. Die methanolischen Extrakte wurden *in vacuo* eingeeengt, mit Wasser verdünnt und ebenfalls der allgemeinen extraktiven Aufarbeitung unterzogen. Die vereinigten Rohextrakte aus insgesamt 3.09 L Kulturbrühe wurden der tabellarisch aufgeführten chromatographischen Reinigung unterzogen (*vide infra*), die massenspektrometrisch verfolgt wurde.

Insgesamt konnten 689 μmol der tabellarisch aufgeführten Proansamitocin-Derivate als farblose Feststoffe isoliert werden (*vide infra*).

Tabelle: Chromatographische Reinigung der Proansamitocin-Derivate **7,9,10, 11a/b**.

PROBE	SYSTEM (KAP. 6.1)	ELUTIONSBEDINGUNGEN	FRAKTIONEN
Rohextrakt	SiO ₂	EE	F-1 (R _f (EE) 0.3-0.05)
F-1	Sephadex LH-20	MeOH	F-2 (M _R = 400-700 Da)
F-2	C18-P _[A] (3 Portionen)	H ₂ O:MeOH [A:B], Flussrate = 4.5 mL/min Gradient (t [min]/B [%]): (0/10) (20/10) (140/90)	F-3 (t _R = 79.5-82.5 min) F-4 (t _R = 85.0-86.5 min) 7 (t _R = 93.5 min) F-5 (t _R = 104.0-105.5 min) F-6 (t _R = 111.5-113.0 min)
F-3 & F-4	C18-SP	H ₂ O:MeOH [A:B], Flussrate = 2.25 mL/min Gradient (t [min]/B [%]): (0/10) (10/10) (90/80)	11a (t _R = 53.0 min) 11b (t _R = 57.0 min)
F-5	CN-SP	H ₂ O:MeCN [A:B], Flussrate = 2.5 mL/min Gradient (t [min]/B [%]): (0/5) (5/5) (45/12) (80/28)	9 (t _R = 58.0 min)
F-6	CN-SP	H ₂ O:MeCN [A:B], Flussrate = 2.5 mL/min Gradient (t [min]/B [%]): (0/5) (5/5) (45/30) (75/45)	10 (t _R = 45.5 min)

Tabelle: Erhaltene Proansamitocin-Derivate **7,9,10, 11a/b**.

DERIVAT	ISOLIERT	AUSBEUTE	
		<i>Fermentation</i>	<i>Relation</i>
7	265 mg (597.5 µmol)	86 mg/L	86.7 %
9	10.9 mg (24.6 µmol)	3.5 mg/L	3.6 %
10	7.2 mg (15.7 µmol)	2.3 mg/L	2.3 %
11a	11.5 mg (25.0 µmol)	3.7 mg/L	3.6 %
11b	11.9 mg (25.9 µmol)	3.9 mg/L	3.8 %

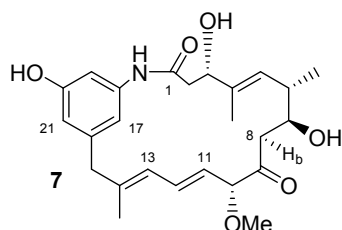
Für eine Untersuchung der Fermentationsüberstände und methanolischen Extrakte vorab standardisierter Volumina mittels analytischer *reversed phase*-HPLC wurde bevorzugt Säule C18-A (siehe 6.1) und Elutionsprogramm B (siehe 6.2; Proansamitocin **7**: t_R = 7.5 min) verwendet, wobei die entsprechenden Integrale in Relation gesetzt wurden.

In einem weiteren Fermentationsansatz mit unterschiedlichem Inokulationsmaterial wurde die Isolierung aus insgesamt 720 mL Kulturbrühe (16 Hauptkulturen à 45 mL Endvolumen, ohne Nylonnetze) vorgenommen. Hierbei konnte Proansamitocin **7** (32 mg, 72.2 µmol, 44.4 mg/L) nach extraktiver Aufarbeitung mit anschließender Filtration über Kieselgel, gefolgt von einer Reinigung über *reversed phase*-HPLC gewonnen werden (*vide supra*, vgl. F-2).

Die analytischen Daten für Proansamitocin **7** stimmen mit den literaturbekannten Angaben überein.³³

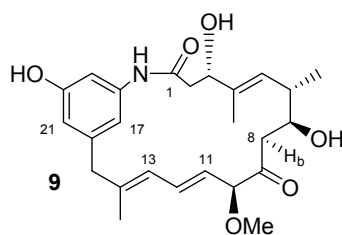
Den NMR-spektroskopisch nahezu identischen Diastereomeren **11a** und **11b** konnte für das entsprechende quartäre C-14-Stereozentrum keine definierte Stereochemie zugewiesen werden (keine Unterschiede bei NOESY-Spektren).

Proansamitocin **7**:

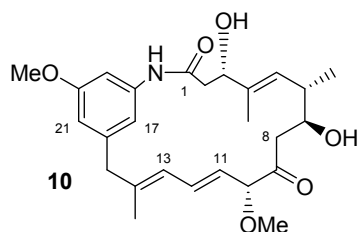


¹H-NMR (500 MHz, Methanol- d_4 , $CHD_2OD = 3.31$ ppm): δ 6.81 (ddd, $J = 15.2, 10.9, 0.7$ Hz, 1H, 12-H), 6.77 (dd, $J = 1.9, 1.9$ Hz, 1H, 19-H), 6.73 (dd, $J = 1.9, 1.9$ Hz, 1H, 17-H), 6.40 (dd, $J = 1.9, 1.9$ Hz, 1H, 21-H), 6.04 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H, 13-H), 5.31 (dd, $J = 15.2, 8.7$ Hz, 1H, 11-H), 5.25 (ddq, $J = 9.4, 1.4, 1.2$ Hz, 1H, 5-H), 4.49 (dd, $J = 8.7, 0.7$ Hz, 1H, 10-H), 4.32 (ddd, $J = 10.0, 4.6, 1.4$ Hz, 1H, 3-H), 4.02 (ddd, $J = 7.6, 5.4, 4.4$ Hz, 1H, 7-H), 3.31 (s, 3H, 10-OMe), 3.30 (d, $J = 13.3$ Hz, 1H, 15- H_a), 3.08 (d, $J = 13.3$ Hz, 1H, 15- H_b), 2.88 (dd, $J = 16.1, 7.6$ Hz, 1H, 8- H_a), 2.62 (dd, $J = 12.6, 4.6$ Hz, 1H, 2- H_a), 2.53 (dd, $J = 12.6, 10.0$ Hz, 1H, 2- H_b), 2.36 (dd, $J = 16.1, 5.4$ Hz, 1H, 8- H_b), 2.17 (ddq, $J = 9.4, 4.4, 6.7$ Hz, 1H, 6-H), 1.71 (s, 3H, 14-Me), 1.60 (d, $J = 1.2$ Hz, 3H, 4-Me), 0.55 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H, 6-Me) ppm; **¹³C-NMR** (125 MHz, Methanol- d_4 , Methanol- $d_4 = 49.00$ ppm): δ 207.5 (s, C-9), 171.0 (s, C-1), 158.5 (s, C-20), 142.9 (s, C-16), 142.3 (s, C-14), 140.3 (s, C-18), 136.8 (s, C-4), 134.8 (d, C-12), 131.1 (d, C-5), 126.8 (d, C-13), 125.5 (d, C-11), 113.4 (d, C-21), 112.8 (d, C-17), 106.7 (d, C-19), 89.3 (d, C-10), 75.9 (d, C-3), 72.3 (d, C-7), 56.8 (q, 10-OMe), 46.8 (t, C-15), 45.6 (t, C-8), 44.5 (t, C-2), 37.9 (d, C-6), 16.8 (q, 14-Me), 14.5 (q, 6-Me), 12.0 (q, 4-Me) ppm; **UPLC-MS** [MeCN] $t_R = 1.38$ min; **HRMS** [ESI] m/z für $C_{25}H_{33}NO_6Na$ $[M+Na]^+$: ber. 466.2206, gef. 466.2207.

10-*epi*-Proansamitocin **9**:



20-*O*-Methyl-proansamitocin 10:

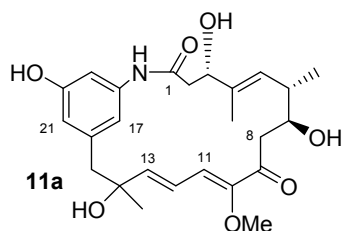


¹H-NMR (500 MHz, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 6.88 (dd, *J* = 1.9, 1.9 Hz, 1H, 17-H), 6.86 (dd, *J* = 1.9, 1.9 Hz, 1H, 19-H), 6.83 (dd, *J* = 15.2, 10.8 Hz, 1H, 12-H), 6.55 (dd, *J* = 1.9, 1.9 Hz, 1H, 21-H), 6.06 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H, 13-H), 5.34 (dd, *J* = 15.2, 8.6 Hz, 1H, 11-H), 5.27 (ddq, *J* = 9.4, 1.1, 1.4 Hz, 1H, 5-H), 4.50 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, 10-H), 4.34 (ddd, *J* = 10.0, 4.5, 1.1 Hz, 1H, 3-H), 4.04 (ddd, *J* = 7.5, 5.6, 5.0 Hz, 1H, 7-H), 3.77 (s, 3H, 20-OMe), 3.36 (s, 3H, 10-OMe), 3.33 (d, *J* = 13.4 Hz, 1H, 15-H_a), 3.16 (d, *J* = 13.4 Hz, 1H, 15-H_b), 2.89 (dd, *J* = 16.1, 7.5 Hz, 1H, 8-H_a), 2.66 (dd, *J* = 12.7, 4.5 Hz, 1H, 2-H_a), 2.55 (dd, *J* = 12.7, 10.0 Hz, 1H, 2-H_b), 2.38 (dd, *J* = 16.1, 5.6 Hz, 1H, 8-H_b), 2.19 (ddq, *J* = 9.4, 5.0, 6.7 Hz, 1H, 6-H), 1.73 (s, 3H, 14-Me), 1.62 (d, *J* = 1.4 Hz, 3H, 4-Me), 0.57 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, 6-Me) ppm;

¹³C-NMR (125 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.00 ppm): δ 207.5 (s, C-9), 171.1 (s, C-1), 161.2 (s, C-20), 143.0 (s, C-16), 142.2 (s, C-14), 140.4 (s, C-18), 136.9 (s, C-4), 134.7

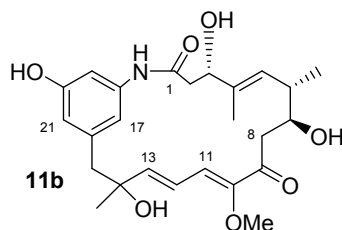
(d, C-12), 131.0 (d, C-5), 127.0 (d, C-13), 125.7 (d, C-11), 113.8 (d, C-17), 112.2 (d, C-21), 105.0 (d, C-19), 89.3 (d, C-10), 75.9 (d, C-3), 72.4 (d, C-7), 56.8 (q, 10-OMe), 55.7 (q, 20-OMe), 46.9 (t, C-15), 45.6 (t, C-8), 44.5 (t, C-2), 38.0 (d, C-6), 16.8 (q, 14-Me), 14.6 (q, 6-Me), 12.1 (q, 4-Me) ppm; **UPLC-MS** [MeCN] t_R = 1.63 min; **UPLC-MS** [MeOH] t_R = 2.13 min; **HRMS** [ESI] m/z für $C_{26}H_{36}NO_6$ $[M+H]^+$: ber. 458.2543, gef. 458.2548.

14-(*Dia-#1*)-Hydroxy- $\Delta^{10,12}$ -proansamitocin **11a**:



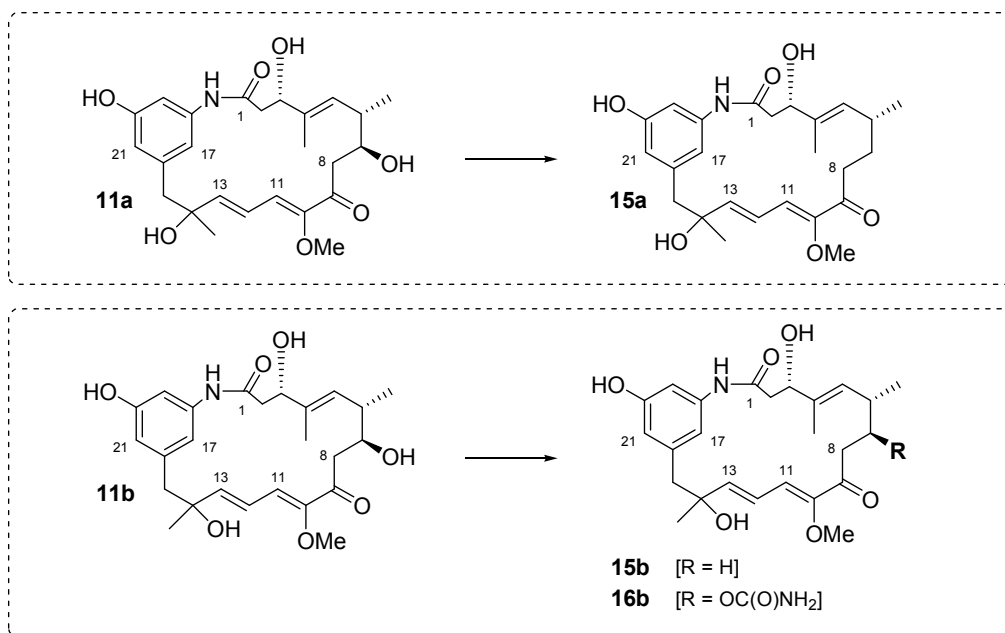
1H -NMR (400 MHz, Methanol- d_4 , CHD_2OD = 3.31 ppm): δ 6.98 (dd, J = 1.9, 1.9 Hz, 1H, 17-H), 6.80 (d, J = 10.7 Hz, 1H, 11-H), 6.70 (dd, J = 1.9, 1.9 Hz, 1H, 19-H), 6.47 (dd, J = 15.6, 10.7 Hz, 1H, 12-H), 6.44 (dd, J = 1.9, 1.9 Hz, 1H, 21-H), 6.22 (d, J = 15.6 Hz, 1H, 13-H), 5.48 (ddq, J = 9.8, 0.9, 1.4 Hz, 1H, 5-H), 4.32 (ddd, J = 8.8, 3.2, 0.9 Hz, 1H, 3-H), 3.82 (ddd, J = 8.6, 6.6, 4.3 Hz, 1H, 7-H), 3.58 (s, 3H, 10-OMe), 2.97 (dd, J = 15.2, 4.3 Hz, 1H, 8- H_a), 2.77 (d, J = 12.6 Hz, 1H, 15- H_a), 2.76 (dd, J = 13.7, 3.2 Hz, 1H, 2- H_a), 2.75 (dd, J = 15.2, 8.6 Hz, 1H, 8- H_b), 2.72 (d, J = 12.6 Hz, 1H, 15- H_b), 2.63 (dd, J = 13.7, 8.8 Hz, 1H, 2- H_b), 2.52 (ddq, J = 9.8, 6.6, 6.6 Hz, 1H, 6-H), 1.66 (d, J = 1.4 Hz, 3H, 4-Me), 1.37 (s, 3H, 14-Me), 1.03 (d, J = 6.6 Hz, 3H, 6-Me) ppm; **^{13}C -NMR** (100 MHz, Methanol- d_4 , Methanol- d_4 = 49.00 ppm): δ 198.6 (s, C-9), 171.1 (s, C-1), 158.3 (s, C-20), 152.7 (s, C-10), 149.7 (d, C-13), 140.2 (s, C-16), 140.0 (s, C-18), 139.0 (s, C-4), 130.7 (d, C-11), 127.8 (d, C-5), 121.4 (d, C-12), 115.5 (d, C-17), 114.6 (d, C-21), 105.8 (d, C-19), 74.5 (d, C-7), 74.2 (s, C-14), 73.0 (d, C-3), 60.7 (q, 10-OMe), 51.7 (t, C-15), 44.7 (t, C-8), 44.3 (t, C-2), 39.3 (d, C-6), 27.3 (q, 14-Me), 16.33 (q, 4-Me), 16.30 (q, 6-Me) ppm; **UPLC-MS** [MeOH] t_R = 1.58 min, [MeCN] t_R = 1.17 min; **HRMS** [ESI] m/z für $C_{25}H_{33}NO_7Na$ $[M+Na]^+$: ber. 482.2155, gef. 482.2151.

14-(*Dia-#2*)-Hydroxy- $\Delta^{10,12}$ -proansamitocin **11b**:



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, Methanol- d_4 , $\text{CHD}_2\text{OD} = 3.31$ ppm): δ 6.94 (dd, $J = 1.9, 1.9$ Hz, 1H, 17-H), 6.75 (dd, $J = 10.8, 0.6$ Hz, 1H, 11-H), 6.69 (dd, $J = 1.9, 1.9$ Hz, 1H, 19-H), 6.53 (dd, $J = 15.4, 10.8$ Hz, 1H, 12-H), 6.45 (dd, $J = 1.9, 1.9$ Hz, 1H, 21-H), 6.13 (dd, $J = 15.4, 0.6$ Hz, 1H, 13-H), 5.49 (ddq, $J = 9.8, 1.9, 1.4$ Hz, 1H, 5-H), 4.33 (ddd, $J = 9.1, 3.0, 1.9$ Hz, 1H, 3-H), 3.84 (ddd, $J = 9.5, 5.8, 4.0$ Hz, 1H, 7-H), 3.59 (s, 3H, 10-OMe), 3.09 (dd, $J = 16.1, 4.0$ Hz, 1H, 8- H_a), 2.80 (dd, $J = 13.9, 3.0$ Hz, 1H, 2- H_a), 2.75 (s, 2H, 15-H), 2.61 (dd, $J = 16.1, 9.5$ Hz, 1H, 8- H_b), 2.59 (dd, $J = 13.9, 9.1$ Hz, 1H, 2- H_b), 2.49 (ddq, $J = 9.8, 5.8, 6.7$ Hz, 1H, 6-H), 1.71 (d, $J = 1.4$ Hz, 3H, 4-Me), 1.34 (s, 3H, 14-Me), 1.02 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H, 6-Me) ppm; **$^{13}\text{C-NMR}$** (100 MHz, Methanol- d_4 , Methanol- $\text{d}_4 = 49.00$ ppm): δ 198.4 (s, C-9), 171.1 (s, C-1), 158.4 (s, C-20), 152.3 (s, C-10), 149.8 (d, C-13), 140.4 (s, C-16), 139.9 (s, C-18), 138.7 (s, C-4), 130.4 (d, C-11), 128.3 (d, C-5), 121.2 (d, C-12), 115.7 (d, C-17), 114.3 (d, C-21), 105.9 (d, C-19), 74.3 (s, C-14), 73.6 (d, C-7), 73.1 (d, C-3), 60.7 (q, 10-OMe), 51.8 (t, C-15), 45.0 (t, C-8), 44.7 (t, C-2), 39.4 (d, C-6), 27.7 (q, 14-Me), 16.3 (q, 4-Me), 16.2 (q, 6-Me) ppm; **UPLC-MS** [MeOH] $t_\text{R} = 1.68$ min, [MeCN] $t_\text{R} = 1.21$ min; **HRMS** [ESI] m/z für $\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{NO}_7\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: ber. 482.2155, gef. 482.2162.

Mutasynthetische Refermentation der Diastereomeren 11a/b



Die Refermentation der Diastereomeren **11a** bzw. **11b** erfolgte unter separater Supplementierung des jeweiligen Derivats zu je einer Kultur von *A. pretiosum* HGF073

(45 mL Endvolumen) entsprechend des unter 6.2 beschriebenen, allgemeinen Fermentationsprotokolls. Die Derivate (je 4.5 mg, 9.8 μmol ; gelöst in 2 mL DMSO:H₂O = 1:1) wurden nach 3.5 Tagen in einer Portion zur jeweiligen Hauptkultur hinzugefügt. Nach weiteren 7 Tagen der Fermentation erfolgte die extraktive Aufarbeitung, wobei der jeweilige Rohextrakt direkt einer chromatographischen Reinigung unterzogen wurde (*vide infra*).

Tabelle: Chromatographische Reinigung der Proansamitocin-Derivate **11a/b**, **15a/b**, **16b**.

PROBE	SYSTEM (KAP. 6.1)	ELUTIONSBEDINGUNGEN	FRAKTIONEN
11a: Rohextrakt bzw. 11b: Rohextrakt	CN-SP	H ₂ O:MeCN [A:B], Flussrate = 2.5 mL/min Gradient (t [min]/B [%]): (0/5) (5/5) (45/12) (80/28)	11a: 11a (t_R = 16.5 min) 11a: F-1 (t_R = 30.0-35.0 min) bzw. 11b: F-1 (t_R = 16.0-31.0 min) 11b: 15b (t_R = 41.5 min)
11a: F-1	C18-SP	H ₂ O:MeOH [A:B], Flussrate = 2.25 mL/min Gradient (t [min]/B [%]): (0/10) (10/10) (90/55)	15a (t_R = 87.5 min)
11b: F-1	C18-SP	H ₂ O:MeOH [A:B], Flussrate = 2.25 mL/min Gradient (t [min]/B [%]): (0/10) (10/10) (90/45)	11b (t_R = 75.0 min) 16b (t_R = 77.0 min)

Die tabellarisch aufgeführten Substanzen konnten als farblose Feststoffe isoliert werden (*vide infra*). Neben den neuen Substanzen **15a/b** und **16b** konnte jeweils Edukt **11a** bzw. **11b** reisoliert werden, wobei die Reisolierungsausbeute aller Substanzen bei 95 % (9.2 μmol), respektive 77 % (7.4 μmol) lag.

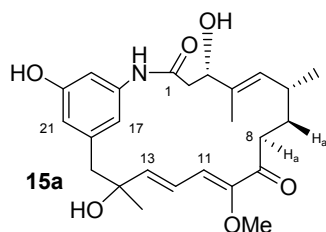
Tabelle: Erhaltene Proansamitocin-Derivate **11a/b**, **15a/b**, **16b**.

DERIVAT	ISOLIERT	AUSBEUTE	
		Fermentation	Relation
11a	3.4 mg (7.4 μmol)	77 %	81 %
15a	0.8 mg (1.8 μmol)	18 %	19 %
11b	1.0 mg (2.2 μmol)	23 %	30 %
15b	1.6 mg (3.6 μmol)	37 %	48 %
16b	0.8 mg (1.6 μmol)	17 %	22 %

Die analytischen Daten der Edukte **11a/b** stimmen mit den an anderer Stelle beschriebenen überein (*vide supra*). Obwohl die neu entstandenen Diastereomere **15a/b** durch Kopplungskonstanten eindeutig bestimmbare Unterschiede der C-7/C-8-Achse aufweisen,

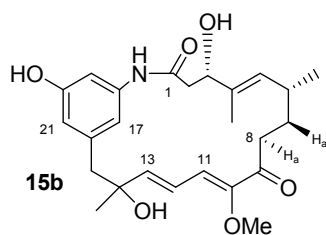
konnten trotzdem keine Rückschlüsse auf die jeweilige Konfiguration des C-14-Zentrums erfolgen (identische 1D-nOe-Kontakte von 4-Me, 6-Me, 14-Me, 15-H, 13-H, 7-H).

7-Desoxy-14-(Dia-#1)-hydroxy- $\Delta^{10,12}$ -proansamitocin **15a**:



¹H-NMR (500 MHz, Methanol- d_4 , CHD_2OD = 3.31 ppm): δ 6.87 (dd, J = 1.9, 1.9 Hz, 1H, 17-H), 6.83 (d, J = 10.8 Hz, 1H, 11-H), 6.75 (dd, J = 1.9, 1.9 Hz, 1H, 19-H), 6.44 (dd, J = 1.9, 1.9 Hz, 1H, 21-H), 6.43 (dd, J = 15.6, 10.8 Hz, 1H, 12-H), 6.22 (d, J = 15.6 Hz, 1H, 13-H), 5.36 (dq, J = 9.9, 1.3 Hz, 1H, 5-H), 4.31 (dd, J = 9.7, 3.4 Hz, 1H, 3-H), 3.52 (s, 3H, 10-OMe), 2.82 (ddd, J = 16.5, 8.4, 6.6 Hz, 1H, 8- H_a), 2.80 (dd, J = 13.5, 3.4 Hz, 1H, 2- H_a), 2.75 (s, 2H, 15-H), 2.62 (ddd, J = 16.5, 6.5, 6.3 Hz, 1H, 8- H_b), 2.53 (dd, J = 13.5, 9.7 Hz, 1H, 2- H_b), 2.40 (dddq, J = 9.9, 9.1, 5.6, 6.4 Hz, 1H, 6-H), 1.82 (dddd, J = 13.5, 8.4, 6.5, 5.6 Hz, 1H, 7- H_a), 1.55 (d, J = 1.3 Hz, 3H, 4-Me), 1.38 (s, 3H, 14-Me), 1.37 (dddd, J = 13.5, 9.1, 6.6, 6.3 Hz, 1H, 7- H_b), 1.00 (d, J = 6.4 Hz, 3H, 6-Me) ppm; **¹³C-NMR** (125 MHz, Methanol- d_4 , Methanol- d_4 = 49.00 ppm): δ 200.0 (s, C-9), 171.0 (s, C-1), 158.4 (s, C-20), 152.3 (s, C-10), 149.6 (d, C-13), 140.2 (s, C-16), 139.8 (s, C-18), 138.4 (s, C-4), 131.0 (d, C-5), 130.5 (d, C-11), 121.5 (d, C-12), 115.9 (d, C-17), 114.6 (d, C-21), 105.9 (d, C-19), 74.4 (s, C-14), 73.2 (d, C-3), 60.7 (q, 10-OMe), 51.3 (t, C-15), 45.7 (t, C-2), 36.6 (t, C-8), 33.5 (t, C-7), 32.3 (d, C-6), 28.1 (q, 14-Me), 21.5 (q, 6-Me), 16.5 (q, 4-Me) ppm; **UPLC-MS** [MeOH] t_R = 1.93 min; **HRMS** [ESI] m/z für $\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{NO}_6\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: ber. 466.2206, gef. 466.2199.

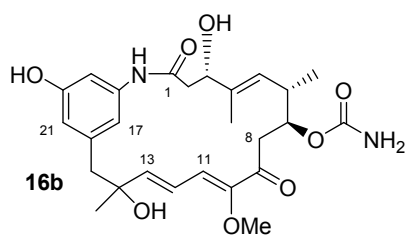
7-Desoxy-14-(Dia-#2)-hydroxy- $\Delta^{10,12}$ -proansamitocin **15b**:



¹H-NMR (500 MHz, Methanol- d_4 , CHD_2OD = 3.31 ppm): δ 6.91 (dd, J = 1.9, 1.9 Hz, 1H, 17-H), 6.78 (d, J = 10.9 Hz, 1H, 11-H), 6.76 (dd, J = 1.9, 1.9 Hz, 1H, 19-H), 6.44 (dd, J = 15.6, 10.9 Hz, 1H, 12-H), 6.43 (dd, J = 1.9, 1.9 Hz, 1H, 21-H), 6.13 (d, J = 15.6 Hz, 1H,

13-H), 5.37 (dq, $J = 9.5, 1.4$ Hz, 1H, 5-H), 4.33 (dd, $J = 9.7, 3.5$ Hz, 1H, 3-H), 3.55 (s, 3H, 10-OMe), 2.81 (ddd, $J = 16.5, 9.5, 5.2$ Hz, 1H, 8-H_a), 2.80 (dd, $J = 13.8, 3.5$ Hz, 1H, 2-H_a), 2.753 (s, 1H, 15-H_a), 2.748 (s, 1H, 15-H_b), 2.60 (ddd, $J = 16.5, 9.4, 6.7$ Hz, 1H, 8-H_b), 2.56 (dd, $J = 13.8, 9.7$ Hz, 1H, 2-H_b), 2.43 (dddq, $J = 9.5, 9.2, 5.4, 6.5$ Hz, 1H, 6-H), 1.71 (dddd, $J = 13.4, 9.5, 6.7, 5.4$ Hz, 1H, 7-H_a), 1.64 (d, $J = 1.4$ Hz, 3H, 4-Me), 1.43 (dddd, $J = 13.4, 9.4, 9.2, 5.2$ Hz, 1H, 7-H_b), 1.35 (s, 3H, 14-Me), 1.00 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, 6-Me) ppm; **¹³C-NMR** (125 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.00 ppm): δ 200.0 (s, C-9), 171.1 (s, C-1), 158.5 (s, C-20), 152.3 (s, C-10), 149.5 (d, C-13), 140.3 (s, C-16), 140.0 (s, C-18), 138.1 (s, C-4), 131.2 (d, C-5), 130.3 (d, C-11), 121.4 (d, C-12), 115.7 (d, C-17), 114.2 (d, C-21), 105.8 (d, C-19), 74.3 (s, C-14), 73.1 (d, C-3), 60.7 (q, 10-OMe), 51.7 (t, C-15), 45.4 (t, C-2), 37.4 (t, C-8), 33.9 (t, C-7), 32.7 (d, C-6), 27.0 (q, 14-Me), 21.4 (q, 6-Me), 16.5 (q, 4-Me) ppm; **UPLC-MS** [MeOH] $t_R = 1.99$ min; **HRMS** [ESI] m/z für C₂₅H₃₃NO₆Na [M+Na]⁺: ber. 466.2206, gef. 466.2209.

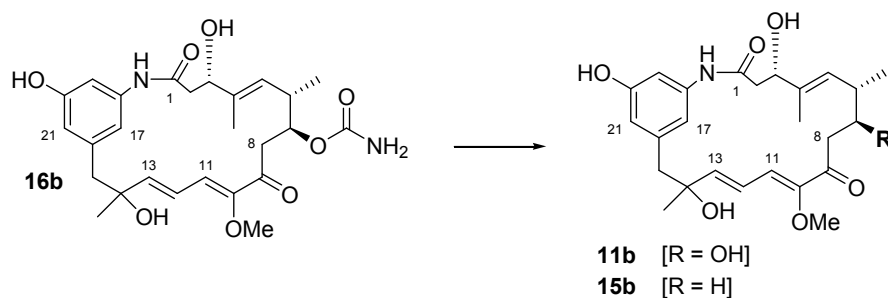
7-*O*-Carbamoyl-14-(*Dia*-#2)-hydroxy- $\Delta^{10,12}$ -proansamitocin **16b**:



¹H-NMR (500 MHz, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 7.19 (dd, $J = 1.9, 1.9$ Hz, 1H, 19-H), 6.87 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H, 11-H), 6.59 (dd, $J = 1.9, 1.9$ Hz, 1H, 17-H), 6.51 (dd, $J = 15.5, 10.7$ Hz, 1H, 12-H), 6.44 (dd, $J = 1.9, 1.9$ Hz, 1H, 21-H), 6.14 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H, 13-H), 5.55 (ddq, $J = 9.7, 1.3, 1.4$ Hz, 1H, 5-H), 5.15 (ddd, $J = 9.2, 5.1, 4.2$ Hz, 1H, 7-H), 4.33 (dd, $J = 10.2, 3.7$ Hz, 1H, 3-H), 3.56 (s, 3H, 10-OMe), 3.05 (dd, $J = 14.3, 5.1$ Hz, 1H, 8-H_a), 2.88 (dd, $J = 14.3, 9.2$ Hz, 1H, 8-H_b), 2.76 (s, 2H, 15-H), 2.72 (dd, $J = 3.7, 12.6$ Hz, 1H, 2-H_a), 2.66 (ddq, $J = 9.7, 4.2, 6.8$ Hz, 1H, 6-H), 2.44 (dd, $J = 12.6, 10.2$ Hz, 1H, 2-H_b), 1.65 (d, $J = 1.4$ Hz, 3H, 4-Me), 1.35 (s, 3H, 14-Me), 1.05 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, 6-Me) ppm; **¹³C-NMR** (125 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.00 ppm): δ 196.9 (s, C-9), 171.2 (s, C-1), 159.7 (s, 7-CONH₂), 158.6 (s, C-20), 152.2 (s, C-10), 149.7 (d, C-13), 140.11 (s, C-16), 140.07 (s, C-18), 139.8 (s, C-4), 131.0 (d, C-11), 127.7 (d, C-5), 121.9 (d, C-12), 115.3 (d, C-17), 114.4 (d, C-21), 106.4 (d, C-19), 75.7 (d, C-7), 74.2 (s, C-14), 73.4 (d, C-3), 60.6 (q, 10-OMe), 51.7 (t, C-15), 47.2 (t, C-2), 43.2 (t, C-8), 37.0 (d, C-6), 26.7 (q, 14-Me), 16.6

(q, 4-Me), 14.6 (q, 6-Me) ppm; **UPLC-MS** [MeOH] $t_R = 1.68$ min; **HRMS** [ESI] m/z für $C_{26}H_{34}N_2O_8Na$ $[M+Na]^+$: ber. 525.2213, gef. 525.2201.

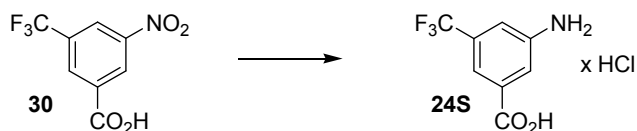
Mutasyntetische Refermentation des Proansamitocin-Derivats **16b**



Die Refermentation des carbamoylierten Proansamitocin-Derivats **16b** erfolgte durch Supplementierung zu einer Kultur von *A. pretiosum* HGF073 (45 mL Endvolumen) entsprechend des unter 6.2 beschriebenen, allgemeinen Fermentationsprotokolls. Das Derivat **16b** (0.1 mg, 0.2 μ mol; gelöst in 1 mL DMSO) wurden nach 2.5 Tagen der Hauptkultur in einer Portion hinzugefügt. Nach weiteren 7 Tagen der Fermentation erfolgte die extractive Aufarbeitung, wobei die zuvor beschriebenen Derivate **11b** und **15b** im konzentrierten und über Kieselgel filtrierten Rohextrakt (1 mL, in MeOH) massenspektrometrisch detektiert wurden. *Die analytischen Daten stimmen mit den zuvor beschriebenen überein (vide supra).*

6.4 Synthese der Verbindungen aus Kapitel 4.1.2

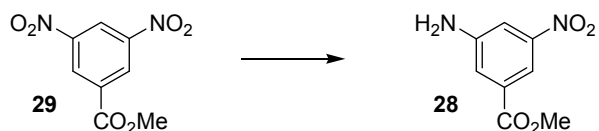
3-Amino-5-(trifluormethyl)benzoesäure-hydrochlorid (**24S**)



3-Nitro-5-(trifluormethyl)benzoesäure (**30**) (1 g, 4.25 mmol, 1 Äq.) wurde mit Palladium [10 % auf Aktivkohle] (227 mg, 0.21 mmol, 5.0 mol-%) vermengt und mit 35 mL Methanol versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 16 Stunden unter Wasserstoffatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Der Katalysator wurde durch Zentrifugation (4000 g, 10 min) entfernt und der Überstand bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 5 mL Ethylacetat aufgenommen, mit fünf Volumen Pentan versetzt und filtriert. Die Prozedur wurde mit dem Filtrat wiederholt, wodurch insgesamt 805 mg Rohprodukt erhalten wurden. Umkristallisation aus halbkonzentrierter Salzsäure [6 M] lieferte Hydrochlorid **24S** (393 mg, 1.63 mmol, 36 %) als farblose Nadeln.

¹H-NMR (400 MHz, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 8.33 (s, 1H, H-Ar), 8.27 (s, 1H, H-Ar), 7.93 (s, 1H, H-Ar) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.00 ppm): δ 166.4 (s, COOH), 135.6 (s, C-3), 134.8 (s, C-1), 133.7 (s/q_{F-C}, *J*_{F-C} = 33.9 Hz, C-5), 128.6 (d, Ar-CH), 125.9 (s/dq_{F-C}, *J*_{F-C} = 216.2, 3.8 Hz, 5-CF₃), 124.8 (d, Ar-CH), 123.1 (d, Ar-CH) ppm; **HRMS** [ESI] *m/z* für C₈H₅F₃NO₂ [M-H]⁺ ber. 204.0272, gef. 204.0276; **Smp.:** 179-208 °C (Zersetzung).

3-Amino-5-nitrobenzoesäuremethylester (**28**)⁵⁹

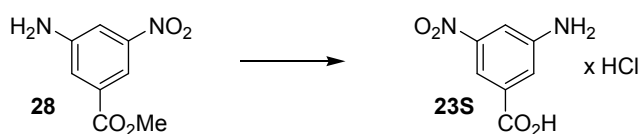


3,5-Dinitrobenzoesäuremethylester (**29**) (25 g, 111 mmol, 1 Äq.) wurde mit Palladium [10 % auf Aktivkohle] (1.22 g, 1.2 mmol, 1.1 mol-%) vermengt. Das Gemisch wurde unter Schutzgas mit frisch destilliertem Triethylamin (69 mL, 498 mmol, 4.5 Äq.) versetzt und unter kräftigem Rühren und Rückfluss erhitzt, wobei Ameisensäure [97 %] (18.5 mL, 476 mmol, 4.3 Äq.) über 10 min hinzuge tropft wurde. Es wurde für weitere 60 Minuten bis

zum vollständigen Umsatz unter Rückfluss erhitzt (Kontrolle per Dünnschichtchromatographie, PE:EE = 1:1). Nach dem Abkühlen wurde die Reaktionslösung mit CH₂Cl₂ verdünnt und der Katalysator durch Filtration entfernt. Nach Einengen im Vakuum lieferte die säulenchromatographische Reinigung (PE:EE = 4:1) Methylester **28** (11.5 g, 58.6 mmol, 53 %) als dunkel-orangen Feststoff (Lit.: 65 %). *Prinzipiell ist auch eine Umkristallisation von durch Säulenchromatographie vorgereinigten Fraktionen aus Methanol möglich, wobei Methylester **28** als leuchtend oranger, staubender Feststoff erhalten werden kann.*

¹H-NMR (400 MHz, Aceton-d₆, Aceton-d₅ = 2.05 ppm): δ 7.94 (dd, *J* = 1.9, 1.9 Hz, 1H, H-Ar), 7.73 (dd, *J* = 1.9, 1.9 Hz, 1H, H-Ar), 7.68 (dd, *J* = 1.9, 1.9 Hz, 1H, H-Ar), 5.65 (bs, 2H, NH₂), 3.91 (s, 3H, COOMe) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, Aceton-d₆, Aceton-d₆ = 206.26 ppm): δ 166.0 (s, COOMe), 151.1 (s, C-3), 150.3 (s, C-5), 133.1 (s, C-1), 120.9 (d, C-2), 112.2 (d, Ar-CH), 111.9 (d, Ar-CH), 52.8 (q, COOMe) ppm; **HRMS** [EI] *m/z* für C₈H₈N₂O₄ [M]⁺ ber. 196.0484, gef. 196.0483; **Smp.:** 162 °C (Lit.: 159-160 °C).

3-Amino-5-nitrobenzoesäure-hydrochlorid (**23S**)

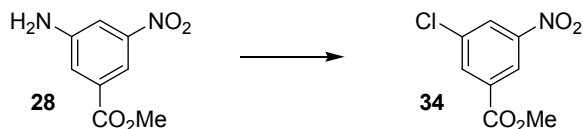


3-Amino-5-nitrobenzoesäuremethylester (**28**) (750 mg, 3.8 mmol, 1 Äq.) wurde in 20 mL Methanol gelöst, mit LiOH·H₂O (797 mg, 19 mmol, 5 Äq.) gelöst in 20 mL Wasser versetzt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit Salzsäure [1 M] auf pH = 4-6 angesäuert und überschüssiger MeOH *in vacuo* entfernt. Die wässrige Lösung wurde viermal mit Ethylacetat extrahiert. Der nach dem Trocknen (MgSO₄) und Einengen der vereinten organischen Phasen erhaltene Rückstand wurde unter Zusatz von Aktivkohle aus halbkonzentrierter Salzsäure [6 M] umkristallisiert. Eine Lagerung der heiß filtrierten Lösung bei -20 °C lieferte Hydrochlorid **23S** (409 mg, 1.87 mmol, 49 %) als braune Kristalle. *Durch Wiederholung dieser Prozedur mit einer Portion (195 mg, 0.89 mmol) des obigen, NMR-reinen Produkts konnte Hydrochlorid **23S** (56 mg, 0.26 mmol) als gelbe Nadeln erhalten werden.*

¹H-NMR (400 MHz, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 8.69 (dd, *J* = 1.8, 1.8 Hz, 1H, H-Ar), 8.34 (dd, *J* = 1.8, 1.8 Hz, 1H, H-Ar), 8.26 (dd, *J* = 1.8, 1.8 Hz, 1H, H-Ar) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.00 ppm): δ 166.3 (s, COOH), 150.5 (s,

C-3), 137.5 (s, C-5), 135.6 (s, C-1), 129.1 (d, C-2), 122.9 (d, Ar-CH), 121.3 (d, Ar-CH) ppm; **HRMS** [ESI] m/z für $C_7H_5N_2O_4$ $[M-H]^-$ ber. 181.0249, gef. 181.0253; **Smp.:** 198-200 °C.

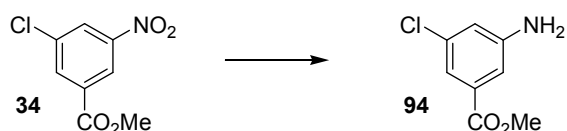
3-Chlor-5-nitrobenzoesäuremethylester (**34**)



3-Amino-5-nitrobenzoesäuremethylester (**28**) (12.0 g, 61.2 mmol, 1 Äq.) wurde in 200 mL Salzsäure [1M] suspendiert, mit 32.6 mL frisch präparierter Cu(I)Cl-Lösung [$c_{\max} \sim 2.5$ M in konzentrierter Salzsäure; erstellt durch literaturbekannte Reduktion von Cu(II)SO₄ durch Natriumsulfit in Gegenwart von Natriumchlorid]¹⁵⁴ ($n_{\max} \sim 82$ mmol, 1.35 Äq.) versetzt und zum Refluxieren erhitzt. In der Siedehitze wurde eine wässrige Natriumnitrit-Lösung (11.04 g, 160 mmol, 2.6 Äq.) in den Reaktionsansatz eingetragen. Nach zehn Minuten wurde der Ansatz auf Raumtemperatur gekühlt und für 60 weitere Minuten gerührt. Die dunkelrote Lösung wurde dreimal mit CH₂Cl₂ extrahiert und die vereinten organischen Phasen *in vacuo* eingengt. Abschließende Wasserdampfdestillation lieferte Methylester **34** (3.0 g, 13.9 mmol, 23 %) als farblose Kristalle.

¹H-NMR (400 MHz, Aceton-d₆, Aceton-d₅ = 2.05 ppm): δ 8.66 (dd, $J = 1.9, 1.9$ Hz, 1H, H-Ar), 8.50 (dd, $J = 1.9, 1.9$ Hz, 1H, H-Ar), 8.35 (dd, $J = 1.9, 1.9$ Hz, 1H, H-Ar), 3.99 (s, 3H, COOMe) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, Aceton-d₆, Aceton-d₆ = 206.26 ppm): δ 164.5 (s, COOMe), 150.0 (s, C-5), 135.6 (d, Ar-CH), 134.3 (s, C-3), 131.2 (s, C-1), 128.3 (d, Ar-CH), 123.3 (s, C-6), 53.5 (q, COOMe) ppm; **HRMS** [EI] m/z für $C_8H_6ClNO_4$ $[M]^+$ ber. 214.9985, gef. 214.9984; **Smp.:** 75-78 °C (Lit.: 79-80 °C).⁵⁸

3-Amino-5-chlorbenzoesäuremethylester (**94**)



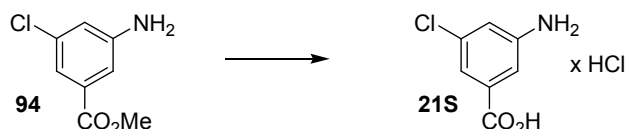
3-Chlor-5-nitrobenzoesäuremethylester (**34**) (2.0 g, 9.3 mmol, 1 Äq.) wurde in 200 mL Ethylacetat gelöst und mit SnCl₂·2H₂O (10.4 g, 46 mmol, 5.0 Äq.) und 5 mL Eisessig versetzt. Die Mischung wurde für 3 Stunden bis zum vollständigen Umsatz (Kontrolle per Dünnschichtchromatographie, CH₂Cl₂:MeOH = 50:1) unter Rückfluss erhitzt, anschließend

¹⁵⁴ H. G. Becker et al, *Organikum*, 20. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim 1999.

unter Zugabe von Eis hydrolysiert und mit NaOH-Lösung [1M] auf pH = 8-9 eingestellt. Die organische Phase wurde abgetrennt, die wässrige Phase einmal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinten organischen Phasen mit NaCl-Lösung gewaschen und getrocknet (MgSO₄). Nach Entfernung des Lösungsmittels *in vacuo* wurde Methylester **94** (1.55 g, 8.4 mmol, 90 %) als gelblicher Feststoff erhalten.

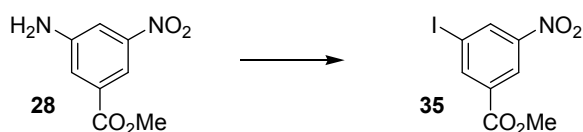
¹H-NMR (400 MHz, Aceton-d₆, Aceton-d₅ = 2.05 ppm): δ 7.25 (dd, *J* = 1.9, 1.9 Hz, 1H, H-Ar), 7.14 (dd, *J* = 1.9, 1.9 Hz, 1H, H-Ar), 6.92 (dd, *J* = 1.9, 1.9 Hz, 1H, H-Ar), 5.24 (bs, 2H, NH₂), 3.84 (s, 3H, COOMe) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, Aceton-d₆, Aceton-d₆ = 206.26 ppm): δ 166.5 (s, COOMe), 151.2 (s, C-3), 135.2 (s, C-5), 133.4 (s, C-1), 118.3 (d, Ar-CH), 117.4 (d, Ar-CH), 114.3 (d, C-2), 52.4 (q, COOMe) ppm; **HRMS** [EI] *m/z* für C₈H₈ClNO₂ [M]⁺ ber. 185.0244, gef. 185.0243; **Smp.:** 90-92 °C (Lit.: 84-86 °C).⁵⁸

3-Amino-5-chlorbenzoesäure-hydrochlorid (**21S**)



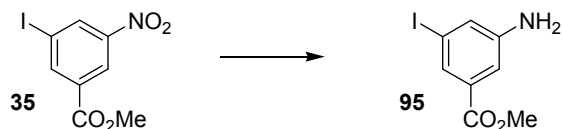
3-Amino-5-chlorbenzoesäuremethylester (**94**) (1.6 g, 8.6 mmol, 1 Äq.) wurde in 27 mL Methanol gelöst, mit LiOH·H₂O (1.7 g, 41 mmol, 4.8 Äq.) gelöst in 42 mL Wasser versetzt und für 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit Salzsäure [1 M] auf pH = 4-6 angesäuert und überschüssiger MeOH *in vacuo* entfernt. Die wässrige Lösung wurde viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit halbkonzentrierter Salzsäure [6 M] extrahiert. Nach Aufkonzentrierung der Lösung *in vacuo* setzte unter Lagerung bei -20 °C die Kristallisation des Hydrochlorids ein. Durch Umkristallisation des gewonnenen Rohprodukts unter Zusatz von Aktivkohle aus halbkonzentrierter Salzsäure [6 M] konnte Hydrochlorid **21S** (1.31 g, 6.3 mmol, 73 %) als farblose Kristalle erhalten werden.

¹H-NMR (400 MHz, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 8.07 (dd, *J* = 1.5, 1.5 Hz, 1H, H-Ar), 7.96 (bs, 1H, H-Ar), 7.68 (bs, 1H, H-Ar) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.00 ppm): δ 166.5 (s, COOH), 136.9 (d, C-3), 135.8 (d, Ar-CH), 134.4 (s, C-5), 130.8 (s, C-1), 128.3 (d, Ar-CH), 123.6 (d, C-2) ppm; **HRMS** [ESI] *m/z* für C₇H₅ClNO₂ [M-H]⁻ ber. 170.0009, gef. 170.0009; **Smp.:** 185-250 °C (Zersetzung).

3-Iod-5-nitrobenzoesäuremethylester (35)

3-Amino-5-nitrobenzoesäuremethylester (**28**) (3.0 g, 15.3 mmol, 1 Äq.) wurde mit Kaliumdisulfit (1.8 g, 7.6 mmol, 0.5 Äq.) fein gemörsert und bei 0°C zu 7.2 mL rauchender Salpetersäure gegeben. Nach 2 Stunden Rühren unter Eiskühlung wurde eine Lösung aus Kaliumiodid (4.8 g, 30.6 mmol, 2.0 Äq.) und Iod (2.4 g, 18.5 mmol, 1.2 Äq.) in 5 mL Wasser langsam hinzuge tropft und der Reaktionsansatz langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Nach 20 Stunden wurde die Reaktionsmischung auf 85 °C erwärmt und zur Entfernung überschüssigen Iods portionsweise mit Natriumdisulfit versetzt. Nach dem Abkühlen wurde die wässrige Phase dreimal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinten organischen Phasen über Nacht mit Kaliumdisulfit gerührt, bevor sie getrocknet (MgSO₄) und eingeeengt wurden. Methylester **35** (1.9 g, 6.2 mmol, 41 %) wurde nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EE = 20:1) als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, Aceton-d₆, Aceton-d₅ = 2.05 ppm): δ 8.78 (dd, *J* = 1.7, 1.7 Hz, 1H, H-Ar), 8.71 (dd, *J* = 1.7, 1.7 Hz, 1H, H-Ar), 8.67 (dd, *J* = 1.7, 1.7 Hz, 1H, H-Ar), 3.98 (s, 3H, COOMe) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, Aceton-d₆, Aceton-d₆ = 206.26 ppm): δ 163.2 (s, COOMe), 148.6 (s, C-5), 143.5 (d, Ar-CH), 135.8 (d, Ar-CH), 133.1 (s, C-1), 123.2 (d, C-6), 93.1 (s, C-3), 52.4 (q, COOMe) ppm; **HRMS** [EI] *m/z* für C₈H₆INO₄ [M]⁺ ber. 306.9342, gef. 306.9340; **Smp.**: 77 °C (Lit.: 73-76 °C).¹⁵⁵

3-Amino-5-iodbenzoesäuremethylester (95)

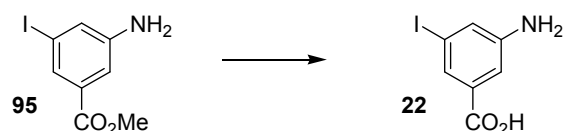
3-Iod-5-nitrobenzoesäuremethylester (**35**) (307 mg, 1 mmol, 1.0 Äq.) wurde in 10 mL Ethylacetat gelöst und mit SnCl₂·2H₂O (1.13 g, 5 mmol, 5.0 Äq.) und 3 Tropfen Eisessig versetzt. Die Mischung wurde für 30 Minuten bis zum vollständigen Umsatz (Kontrolle per Dünnschichtchromatographie, PE:EE = 4:1) unter Rückfluss erhitzt, anschließend unter Zugabe von Eis hydrolysiert und mit NaHCO₃-Lösung neutralisiert. Die organische Phase wurde abgetrennt, die wässrige Phase zweimal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinten

¹⁵⁵ R. E. Counsell, T. D. Smith, V. V. Ranade, O. P. D. Noronha, P. Desai, *J. Med. Chem.* **1973**, *16*, 684-687.

organischen Phasen mit NaCl-Lösung gewaschen und getrocknet (MgSO₄). Umkristallisation des nach Einengen des Lösungsmittels erhaltenen Feststoffs aus Petrolether:Ethylacetat lieferte Methylester **95** (198 mg, 0.72 mmol, 72 %) nach Lagerung bei -20 °C als breite, beige-farbene Plättchen.

¹H-NMR (400 MHz, Aceton-d₆, Aceton-d₅ = 2.05 ppm): δ 7.51 (dd, *J* = 1.8, 1.8 Hz, 1H, H-Ar), 7.31 (dd, *J* = 1.8, 1.8 Hz, 1H, H-Ar), 7.29 (dd, *J* = 1.8, 1.8 Hz, 1H, H-Ar), 5.16 (bs, 2H, NH₂), 3.84 (s, 3H, COOMe); **¹³C-NMR** (100 MHz, Aceton-d₆, Aceton-d₆ = 206.26 ppm): δ 166.3 (s, COOMe), 151.2 (s, C-3), 133.4 (s, C-1), 127.4 (d, Ar-CH), 126.6 (d, Ar-CH), 120.8 (d, C-2), 94.9 (s, C-5), 52.5 (q, COOMe) ppm; **HRMS** [EI] *m/z* für C₈H₈INO₂ [M]⁺ ber. 276.9600, gef. 276.9602; **Smp.:** 92 °C (Lit.: 89-93 °C).¹⁵⁵

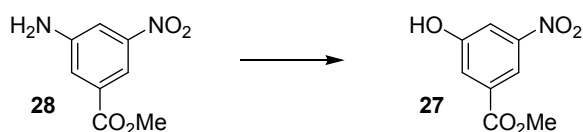
3-Amino-5-iodbenzoesäure (**22**)



3-Amino-5-iodbenzoesäuremethylester (**95**) (176 mg, 635 μmol, 1 Äq.) wurde in 2.5 mL MeOH gelöst, mit 0.76 mL LiOH_(aq) [1 M] (0.76 mmol, 1.2 Äq.) versetzt und 6 Stunden bei Raumtemperatur bis zum vollständigen Umsatz gerührt (Kontrolle per Dünnschichtchromatographie, EE). Überschüssiger MeOH wurde anschließend *in vacuo* entfernt und die verbliebene Lösung mit Salzsäure [1 M] auf pH = 4-6 eingestellt. Die wässrige Lösung wurde verdünnt und sechsmal mit Ethylacetat extrahiert. Der nach Trocknung (MgSO₄) und Einengung der vereinten organischen Phasen erhaltene Rückstand wurde in MeOH gelöst und unter Zusatz von Aktivkohle und Rückfluss erhitzt. Umkristallisation des nach Filtration und Einengung erhaltenen Rohprodukts aus MeOH:Wasser lieferte Benzoesäure **22** (146 mg, 555 μmol, 87 %) als farblose Kristalle.

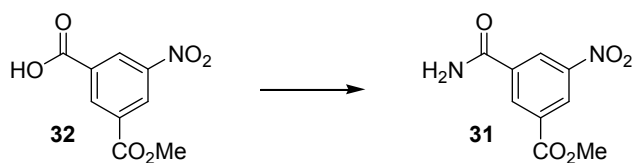
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, DMSO-d₅ = 2.50 ppm): δ 7.32 (dd, *J* = 1.8, 1.8 Hz, 1H, H-Ar), 7.14 (dd, *J* = 1.8, 1.8 Hz, 1H, H-Ar), 7.12 (dd, *J* = 1.8, 1.8 Hz, 1H, H-Ar), 5.57 (bs, 2H, NH₂); **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-d₆, DMSO-d₆ = 39.52 ppm): δ 166.4 (s, COOH), 150.5 (s, C-3), 133.2 (s, C-1), 125.4 (d, Ar-CH), 124.4 (d, Ar-CH), 113.9 (d, C-2), 94.9 (s, C-5); **HRMS** [ESI] *m/z* für C₇H₅INO₂ [M-H]⁻ ber. 261.9365, gef. 261.9364; **Smp.:** 198-200 °C (Lit.: 198-199 °C).¹⁵⁶

¹⁵⁶ H. Cassebaum, *Arch. Pharm.* **1959**, 292, 565-578.

3-Hydroxy-5-nitrobenzoesäuremethylester (27)

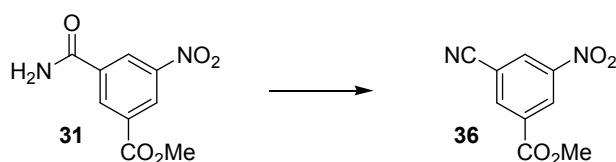
3-Amino-5-nitrobenzoesäuremethylester (**28**) (6 g, 30.5 mmol, 1 Äq.) wurde in einer Mischung aus 21.6 mL Wasser und 15.6 mL konzentrierter Schwefelsäure suspendiert und durch ein NaCl-/Eisbad gekühlt. Über 20 Minuten wurde Natriumnitrit (2.32 g, 33.6 mmol, 1.1 Äq.) gelöst in 5 mL Wasser hinzugefügt und für weitere 60 Minuten unter Eiskühlung gerührt. Die Diazoniumsalzsuspension wurde anschließend in eine refluxierende Mischung aus 17 mL Wasser und 23 mL konzentrierter Schwefelsäure eingetragen. Nach 45 Minuten wurde die Mischung abgekühlt, unter Verwendung von Natronplättchen teilneutralisiert ($\text{pH} = 2\text{-}3$) und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit NaCl-Lösung gewaschen, getrocknet (MgSO_4) und bis zur Trockene eingeeengt. Zur Wiederveresterung wurde der Rückstand in 60 mL MeOH aufgenommen, unter Stickstoffatmosphäre eiskühlt und mit Thionylchlorid (3.3 mL, 46 mmol, 1.5 Äq.) versetzt. Nach Rühren über Nacht bei Raumtemperatur wurde die Mischung mit 60 mL Wasser versetzt und überschüssiger MeOH *in vacuo* entfernt. Der wässrige Rückstand wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinten organischen Phasen mit NaCl-Lösung gewaschen, getrocknet (MgSO_4) und bis zur Trockene eingeeengt. Der Rückstand wurde über Kieselgel filtriert (EE + 0.1 % AcOH) und anschließend aus MeOH:Wasser umkristallisiert. Methylester **27** (3.50 g, 17.8 mmol, 58 %) wurde als beige-farbener Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, Aceton- d_6 , Aceton- $\text{d}_5 = 2.05$ ppm): δ 9.67 (s, 1H, 3-OH), 8.24 (dd, $J = 1.9, 1.9$ Hz, 1H, H-Ar), 7.87 (dd, $J = 1.9, 1.9$ Hz, 1H, H-Ar), 7.83 (dd, $J = 1.9, 1.9$ Hz, 1H, H-Ar), 3.95 (s, 3H, COOMe) ppm; **$^{13}\text{C-NMR}$** (100 MHz, Aceton- d_6 , Aceton- $\text{d}_6 = 206.26$ ppm): δ 165.4 (s, COOMe), 159.3 (s, C-3), 150.2 (s, C-5), 133.7 (s, C-1), 122.9 (d, C-1), 115.8 (d, Ar-CH), 114.9 (d, Ar-CH), 53.1 (q, COOMe) ppm; **HRMS** [EI] m/z für $\text{C}_8\text{H}_7\text{NO}_5$ $[\text{M}]^+$ ber. 197.0324, gef. 197.0324; **Smp.:** 153-155 °C (Lit.: 156-157 °C).⁶⁵

5-Nitroisophthalamsäuremethylester (31)

5-Nitroisophthalsäuremonomethylester (**32**) (10 g, 44.4 mmol, 1.0 Äq.) wurde in 67 mL Toluol gelöst und mit einem Tropfen DMF (kat.) und Thionylchlorid (26.4 g, 16.1 mL, 222 mmol, 5.0 Äq) versetzt. Die Reaktionslösung wurde bis zum vollständigen Umsatz unter Schutzgas und Rückfluss erhitzt (Kontrolle per Dünnschichtchromatographie, PE:EE = 4:1). Das Lösungsmittel wurde anschließend *in vacuo* entfernt und der Rückstand unter Schutzgas in CH₂Cl₂ aufgenommen. Unter kräftigem Rühren wurde NH_{3(g)} in die Reaktionslösung eingeleitet, wobei ein farbloser Feststoff ausfiel. Nach Abschluß der Präzipitation wurde die Gaseinleitung beendet und die Reaktionsmischung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels *in vacuo* wurde der Rückstand zur Entfernung von Ammoniumchlorid zweimal in heißem Wasser aufgeschlämmt, unter Rückfluss erhitzt und heiß filtriert. Waschen des feuchten Retentats mit eiskaltem MeOH und Trocknen des Rückstands *in vacuo* lieferte Methylester **31** (8.5 g, 37.9 mmol, 85 %) als farblosen Feststoff.

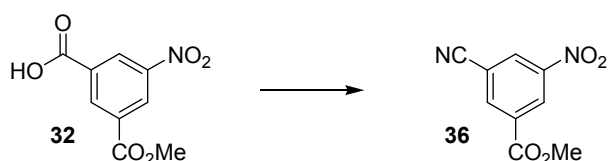
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, DMSO-d₅ = 2.50 ppm): δ 8.93 (dd, *J* = 1.8, 1.8 Hz, 1H, H-Ar), 8.82 (dd, *J* = 1.8, 1.8 Hz, 1H, H-Ar), 8.72 (dd, *J* = 1.8, 1.8 Hz, 1H, H-Ar), 8.55 (bs, 1H, CONH_a), 7.86 (bs, 1H, CONH_b), 3.96 (s, 3H, COOMe) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-d₆, DMSO-d₆ = 39.52 ppm): δ 164.7 (s, CONH₂), 164.2 (s, COOMe), 148.1 (s, C-5), 136.4 (s, C-3), 133.7 (d, Ar-CH), 131.5 (s, C-1), 126.3 (d, Ar-CH), 125.9 (d, Ar-CH), 53.0 (q, COOMe) ppm; **HRMS** [EI] *m/z* für C₉H₈N₂O₅ [M]⁺ ber. 224.0433, gef. 224.0432; **Smp.**: 215-227 °C (Zersetzung).

3-Cyano-5-nitrobenzoesäuremethylester (36)

5-Aminoisophthalamsäuremethylester (**31**) (4.48 g, 20 mmol, 1 Äq.) wurde unter Argonatmosphäre in 100 mL CH₂Cl₂ suspendiert, unter Rühren bei Raumtemperatur tropfenweise mit DBU (7.45 g, 60 mmol, 3 Äq.) versetzt. Nach 20 Minuten wurde Phenyldichlorphosphat (8.44 g, 40 mmol, 2 Äq.) zur Reaktionsmischung hinzuge tropft und bis zum vollständigen

Umsatz bei Raumtemperatur gerührt (Kontrolle per Dünnschichtchromatographie, EE). Unverbrauchtes Phenyldichlorphosphat wurde durch Zusatz eines Überschusses an NH_4Cl -Lösung inaktiviert. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase einmal mit CH_2Cl_2 extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit NaCl -Lösung gewaschen, getrocknet (MgSO_4) und eingengt. Methylester **36** (3.89 g, 18.9 mmol, 95 %) wurde nach säulenchromatographischer Reinigung ($\text{PE:EE} = 4:1$) als farbloser Feststoff erhalten.

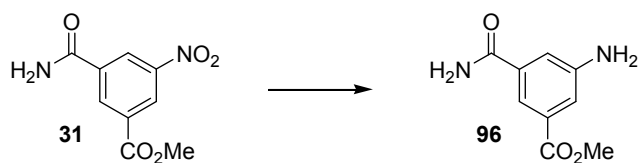
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , $\text{CHCl}_3 = 7.26$ ppm): δ 9.06 (dd, $J = 1.7, 1.7$ Hz, 1H, H-Ar), 8.69 (dd, $J = 1.7, 1.7$ Hz, 1H, H-Ar), 8.63 (dd, $J = 1.7, 1.7$ Hz, 1H, H-Ar), 4.04 (s, 3H, COOMe) ppm; **$^{13}\text{C-NMR}$** (100 MHz, CDCl_3 , $\text{CDCl}_3 = 77.16$ ppm): δ 163.2 (s, COOMe), 148.6 (s, C-5), 138.3 (d, C-2), 133.6 (s, C-1), 130.7 (d, Ar-CH), 128.4 (d, Ar-CH), 115.9 (s, C-3), 114.8 (s, CN), 53.6 (q, COOMe) ppm; **HRMS** [EI] m/z für $\text{C}_9\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_4$ $[\text{M}]^+$ ber. 206.0328, gef. 206.0328; **Smp.:** 138 °C (Lit.: 137-138 °C).¹⁵⁷



5-Nitroisophthalsäuremonomethylester (**32**) (2.25 g, 10 mmol, 1.0 Äq.) wurde mit Sulfamid $\{\text{SO}_2(\text{NH}_2)_2\}$ (1.15 g, 12 mmol, 1.2 Äq.) vermengt und in einem Schlenkrohr in 12 mL Sulfolan suspendiert. Unter Stickstoffstrom wurde Thionylchlorid (2.1 mL, 30 mmol, 3.0 Äq.) hinzugefügt und das Gemisch unter Rückflusskühlung *via* Mikrowellenstrahlung erhitzt (150 W, 15 min, ~ 80 °C). Diese Prozedur wurde unter jeweils erneuter Zugabe von Thionylchlorid (2.1 mL, 30 mmol, 3.0 Äq.) dreimal bis zum vollständigen Umsatz wiederholt (Kontrolle per Dünnschichtchromatographie, EE). Die auf Raumtemperatur abgekühlte Reaktionsmischung wurde in 150 mL eisgekühlte NaHCO_3 -Lösung eingerührt, die dreimal mit CH_2Cl_2 extrahiert wurde. Die vereinten organischen Phasen wurden mit NaCl -Lösung gewaschen, getrocknet und *in vacuo* eingengt. Aus dem Rückstand kristallisierte Methylester **36** (1.54 g, 7.5 mmol, 75 %) als bräunlicher Feststoff aus.

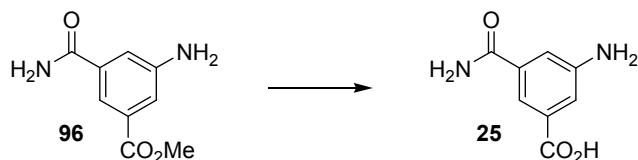
Die analytischen Daten stimmen mit den oben angegebenen überein.

¹⁵⁷ H.J. Barber, R. Slack, *J. Chem. Soc.* **1947**, 82-84.

5-Aminoisophthalamsäuremethylester (96)

5-Nitroisophthalamsäuremethylester (**31**) (336 mg, 1.5 mmol, 1.0 Äq.) wurde in 10 mL Ethylacetat suspendiert und mit $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1.69 g, 7.5 mmol, 5.0 Äq.) und 3 Tropfen Eisessig versetzt. Die Mischung wurde für 30 Minuten bis zum vollständigen Umsatz (Kontrolle per Dünnschichtchromatographie, EE) unter Rückfluss erhitzt, anschließend unter Zugabe von Eis hydrolysiert und mit NaHCO_3 -Lösung neutralisiert. Die organische Phase wurde abgetrennt, die wässrige Phase zweimal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinten organischen Phasen mit NaCl-Lösung gewaschen und getrocknet (MgSO_4). Umkristallisation des nach Einengen des Lösungsmittels erhaltenen Feststoffs aus Ethylacetat lieferte Methylester **96** (237 mg, 1.2 mmol, 81 %) als farblose Kristalle.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6 , $\text{DMSO-d}_5 = 2.50$ ppm): δ 7.94 (bs, 1H, CONH_a), 7.57 (dd, $J = 1.8, 1.8$ Hz, 1H, H-Ar), 7.30 (dd, $J = 1.8, 1.8$ Hz, 1H, H-Ar), 7.26 (dd, $J = 1.8, 1.8$ Hz, 1H, H-Ar), 7.26 (bs, 1H, CONH_b), 5.54 (bs, 2H, NH_2), 3.82 (s, 3H, COOMe) ppm; **$^{13}\text{C-NMR}$** (100 MHz, DMSO-d_6 , $\text{DMSO-d}_6 = 39.52$ ppm): δ 167.9 (s, CONH_2), 166.4 (s, COOMe), 149.0 (s, C-5), 135.8 (s, C-3), 130.2 (s, C-1), 117.3 (d, Ar-CH), 116.4 (d, Ar-CH), 115.3 (d, Ar-CH), 52.0 (q, COOMe) ppm; **HRMS** [ESI] m/z für $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ber. 217.0589, gef. 217.0591; **Smp.:** 150 °C.

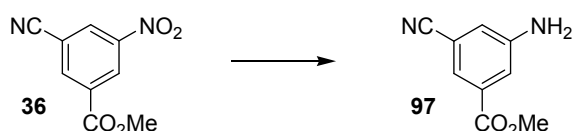
5-Aminoisophthalamsäure (25)

5-Aminoisophthalamsäuremethylester (**96**) (234 mg, 1.2 mmol, 1 Äq.) wurde in 2 mL MeOH partiell gelöst, mit 1.45 mL $\text{LiOH}_{(\text{aq})}$ [1 M] (1.45 mmol, 1.2 Äq.) versetzt und 4 Stunden bei Raumtemperatur bis zum vollständigen Umsatz gerührt (Kontrolle per Dünnschichtchromatographie, EE). Die Mischung wurde anschließend mit Salzsäure [1 M] neutralisiert und überschüssiger MeOH *in vacuo* entfernt. Die verbliebene Lösung wurde mit verdünnter Salzsäure [1 M] auf pH = 4-6 eingestellt, wobei eine sofortige Kristallisation erfolgte. Nach erfolgter Filtration wurde das Retentat aus Methanol:Wasser umkristallisiert

und mit Wasser gewaschen. Isophthalamsäure **25** (72 mg, 0.4 mmol, 33 %) wurde als blass-gelbe Nadeln erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, DMSO-d₅ = 2.50 ppm): δ 7.91 (bs, 1H, CONH_a), 7.56 (dd, *J* = 1.7, 1.7 Hz, 1H, H-Ar), 7.28 (dd, *J* = 1.7, 1.7 Hz, 1H, H-Ar), 7.24 (dd, *J* = 1.7, 1.7 Hz, 1H, H-Ar), 7.22 (bs, 1H, CONH_b), 5.47 (bs, 2H, NH₂) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-d₆, DMSO-d₆ = 39.52 ppm): δ 168.1 (s, COOH), 167.5 (s, CONH₂), 148.9 (s, C-5), 135.6 (s, C-3), 131.4 (s, C-1), 117.0 (d, Ar-CH), 116.8 (d, Ar-CH), 115.6 (d, Ar-CH); **HRMS** [ESI] *m/z* für C₈H₇N₂O₃ [M-H]⁻ ber. 179.0457, gef. 179.0452; **Smp.:** 246 °C.

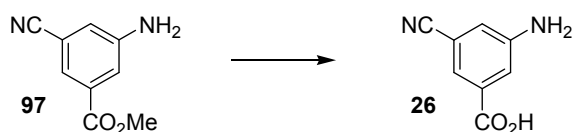
3-Amino-5-cyanobenzoessäuremethylester (**97**)



3-Cyano-5-nitrobenzoessäuremethylester (**36**) (3.76 g, 18.2 mmol, 1.0 Äq.) wurde in 100 mL Ethylacetat gelöst und mit SnCl₂·2H₂O (20.5 g, 91 mmol, 5.0 Äq.) und 1 mL Eisessig versetzt. Die Mischung wurde für 90 Minuten bis zum vollständigen Umsatz (Kontrolle per Dünnschichtchromatographie, EE) unter Rückfluss erhitzt, anschließend unter Zugabe von Eis hydrolysiert und mit NaHCO₃-Lösung neutralisiert. Die organische Phase wurde abgetrennt, die wässrige Phase zweimal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinten organischen Phasen mit NaCl-Lösung gewaschen und getrocknet (MgSO₄). Umkristallisation des nach Einengen des Lösungsmittels erhaltenen Feststoffs aus MeOH lieferte Methylester **97** (2.8 g, 15.9 mmol, 87 %) als blass-gelbe Rhomben.

¹H-NMR (400 MHz, Aceton-d₆, Aceton-d₅ = 2.05 ppm): δ 7.57 (dd, *J* = 1.9, 1.9 Hz, 1H, H-Ar), 7.46 (dd, *J* = 1.9, 1.9 Hz, 1H, H-Ar), 7.19 (dd, *J* = 1.9, 1.9 Hz, 1H, H-Ar), 5.48 (bs, 2H, NH₂), 3.88 (s, 3H, COOMe) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, Aceton-d₆, Aceton-d₆ = 206.26 ppm): δ 166.2 (s, COOMe), 150.8 (s, C-3), 133.3 (s, C-1), 120.9 (d, Ar-CH), 120.9 (d, Ar-CH), 119.7 (d, Ar-CH), 119.3 (s, CN), 114.0 (s, C-5), 52.8 (q, COOMe) ppm; **HRMS** [EI] *m/z* für C₉H₈N₂O₂ [M]⁺ ber. 176.0586, gef. 176.0587; **Smp.:** 126 °C (Lit.: 121 °C).¹⁵⁸

¹⁵⁸ P. Chand, Y. S. Babu, S. Bantia, N. Chu, L. B. Cole, P. L. Kotian, W. G. Laver, J. A. Montgomery, V. P. Pathak, S. L. Petty, D. P. Shrout, D. A. Walsh, G. M. Walsh, *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 4030-4032.

3-Amino-5-cyanobenzoessäure (26)

3-Amino-5-cyanobenzoessäuremethylester (**97**) (2.156 g, 12.2 mmol, 1 Äq.) wurde in 15 mL MeOH gelöst, mit 14.7 mL LiOH_(aq) [1 M] (14.7 mmol, 1.2 Äq.) versetzt und 2 Stunden bei Raumtemperatur bis zum vollständigen Umsatz gerührt (Kontrolle per Dünnschichtchromatographie, EE). Die Mischung wurde anschließend mit verdünnter Salzsäure [1 M] neutralisiert und überschüssiger MeOH *in vacuo* entfernt. Die verbliebene Lösung wurde mit Salzsäure [1 M] auf pH = 4-6 eingestellt, mit Wasser auf 50 mL verdünnt und sechsmal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit NaCl-Lösung gewaschen, getrocknet (MgSO₄) und bis zur Trockene eingedunstet. Das Rohprodukt wurde unter Zusatz von Aktivkohle in MeOH aufgenommen, unter Rückfluss erhitzt und heiß filtriert. Nach Umkristallisation des nach Einengung erhaltenen Feststoffs aus MeOH:Wasser wurde Benzoessäure **26** (1.55 g, 9.56 mmol, 78 %) als blassgrünliche, feine Nadeln erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆, DMSO-d₅ = 2.50 ppm): δ 7.44 (dd, *J* = 1.8, 1.8 Hz, 1H, H-Ar), 7.33 (dd, *J* = 1.8, 1.8 Hz, 1H, H-Ar), 7.06 (dd, *J* = 1.8, 1.8 Hz, 1H, H-Ar), 5.90 (bs, 2H, NH₂) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-d₆, DMSO-d₆ = 39.52 ppm): δ 166.2 (s, COOH), 149.9 (s, C-3), 132.8 (s, C-1), 119.2 (s, CN), 119.0 (d, Ar-CH), 118.8 (d, Ar-CH), 118.7 (d, Ar-CH), 111.9 (s, C-5) ppm; **HRMS** [ESI] *m/z* für C₈H₅N₂O₂ [M-H]⁻ ber. 161.0351, gef. 161.0345; **Smp.**: 253 °C.

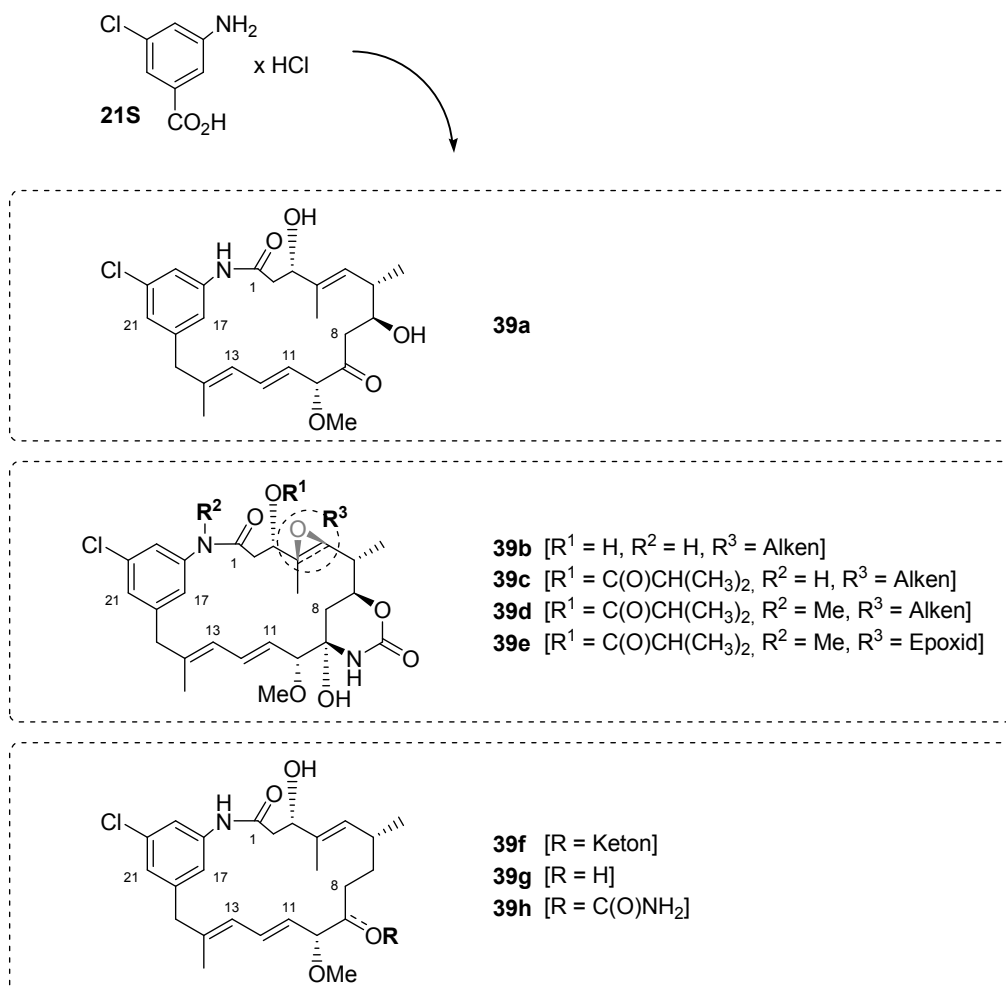
6.5 Mutasyntesen aus Kapitel 4.1.2

Allgemeine Hinweise zu Mutasyntesen mit *A. pretiosum* HGF073

Die Fermentation von *A. pretiosum* HGF073 erfolgte nach dem unter 6.2 beschriebenen Fermentationsprotokoll. Mutasyntehone (vorzugsweise 1.25 mmol/L Kulturvolumen) wurden in DMSO:Wasser (vorzugsweise 1:1, Volumen der Mutasynton-Lösung weniger als 10 % {v/v} des Kulturvolumens) gelöst und steril filtriert, bevor die Zugabe zu den 2 Tage vorinkubierten Hauptkulturen eingeleitet wurde. Die Zugabe erfolgte entweder portionsweise (3 Portionen mit 24 Stunden-Intervall, für Testansätze), oder vorzugsweise kontinuierlich (tropfenweise, für Isolierungsansätze) über einen Zeitraum von 3.5 Tagen mittels Spritzenpumpen-Zuleitungssystemen (BRAINTREE SCIENTIFIC BS-9000-8 Spritzenpumpe mit UPCHURCH SCIENTIFIC high-purity Teflon[®] PFA Kapillaren {1/16“ OD, 0.1“ ID) und Tefzel[®]-Anschlüssen). Bei neuen Mutasyntonhen wurden zur Sicherstellung der Produktivität des Stamms grundsätzlich parallele Referenzkulturen unter AHBA-Supplementation durchgeführt. Nach einer Gesamtfermentationszeit von 7-10 Tagen erfolgte eine massenspektrometrische Analyse mittels UPLC-ESI(+)-MS zunächst aus Proben des Fermentationsüberstands (vgl. 6.2). Wenn keine Zielprodukte entdeckt werden konnten, wurde die Kulturbrühe einer extraktiven Aufarbeitung unterzogen (vgl. 6.2), woraufhin die vereinigten Rohextrakte gegebenenfalls mit Ethylacetat über Kieselgel filtriert und *in vacuo* eingengt wurden. Der Rückstand wurde in 1 mL Methanol gelöst und einer UPLC-ESI(+)-MS-Analyse unterzogen.

Für Analysen des Fermentationsüberstands mittels analytischer *reversed phase*-HPLC wurde bevorzugt Säule C18-A (siehe 6.1) und Elutionsprogramm A (siehe 6.2) verwendet.

19-Dechlor-20-chloransamitocin-Derivate 39a-h



Die mutasynthetische Darstellung der 19-Dechlor-20-chloransamitocin-Derivate **39a-h** erfolgte unter Supplementierung des Mutasynthons **21S** zu Kulturen von *A. pretiosum* HGF073 entsprechend des unter 6.5 beschriebenen allgemeinen Fermentationsprotokolls für Mutasynthesen entweder mit kontinuierlicher Mutasynthon-Zugabe durch Spritzenpumpensysteme (765 mL Fermentationsansätze) oder durch portionsweise Zugabe (180 mL Fermentationsansätze), gefolgt von extraktiver Aufarbeitung (vgl. 6.2). In der Summe wurden 1.18 mmol (245 mg) des Aminobenzoesäure-Hydrochlorids **21S** (gelöst in DMSO:Wasser = 1:1) zu insgesamt 945 mL Fermentationsansätzen supplementiert (1.25 mmol/L). Die vereinigten Rohextrakte wurden der tabellarisch aufgeführten chromatographischen Reinigung unterzogen (*vide infra*), die massenspektrometrisch verfolgt wurde.

Tabelle: Chromatographische Reinigung der Ansamitocin-Derivate **39a-h**.

PROBE	SYSTEM (KAP 6.1)	ELUTIONSBEDINGUNGEN	FRAKTIONEN
Rohextrakt	SiO ₂	PE:EE 4:1 → EE	F-1 (R _f (EE) 0.6-0.05)
F-1	C18-P _[A]	H ₂ O:MeOH [A:B], Flussrate = 5.0 mL/min Gradient (t [min]/B [%]): (0/20) (5/20) (60/60) (120/100)	F-2 (t _R = 104.0-115.0 min)
F-2	CN-SP	H ₂ O:MeCN [A:B], Flussrate = 2.5 mL/min Gradient (t [min]/B [%]): (0/5) (5/5) (45/30) (55/35) (85/45)	39a (t _R = 60.0 min) F-3 (t _R = 61.0-63.5 min) F-4 (t _R = 63.5-66.0 min & 72.0-74.5 min) F-5 (t _R = 66.5-69.0 min) F-6 (t _R = 70.5-72.0 min) F-7 (t _R = 76.0-78.5 min)
F-3	C18-SP	H ₂ O:MeCN [A:B], Flussrate = 2.5 mL/min Gradient (t [min]/B [%]): (0/5) (5/5) (45/30) (55/35) (85/45) (90/50) (90.1/100) (100/100)	39b (t _R = 81.0 min) 39f (t _R = 86.0 min)
F-4	C18-SP	H ₂ O:MeCN [A:B], Flussrate = 2.5 mL/min Gradient (t [min]/B [%]): (0/5) (5/5) (45/30) (55/35) (85/45) (90/50) (90.1/100) (100/100)	39g (t _R = 89.5 min)
F-5	C18-SP	H ₂ O:MeCN [A:B], Flussrate = 2.5 mL/min Gradient (t [min]/B [%]): (0/5) (5/5) (45/30) (55/35) (85/45) (90/50) (90.1/100) (100/100)	39h (t _R = 93.5 min) 39e (t _R = 96.0 min)
F-6	C18-SP	H ₂ O:MeCN [A:B], Flussrate = 2.5 mL/min Gradient (t [min]/B [%]): (0/5) (5/5) (45/30) (55/35) (85/45) (115/65)	39d (t _R = 103.5 min)
F-7	C18-SP	H ₂ O:MeCN [A:B], Flussrate = 2.5 mL/min Gradient (t [min]/B [%]): (0/5) (5/5) (45/30) (55/35) (85/45) (115/65)	39c (t _R = 105.0 min)

Die tabellarisch aufgeführten Derivate konnten als farblose Feststoffe erhalten oder massenspektrometrisch charakterisiert werden (*vide infra*). Insgesamt konnten 18.7 µmol Ansamitocin-Derivate in einer Ausbeute von 1.6 % isoliert werden.

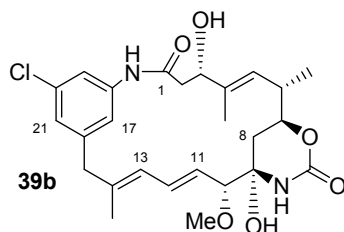
Die Zuordnung der ¹³C-Signale basiert für das Derivat **39f** ausschließlich auf HSQC- und HMBC-Experimenten. Aufgrund dieser Datenbasis konnte dem quartären, aromatischen Kohlenstoff C-18 kein Signal zugewiesen werden, welches in der nachfolgenden Niederschrift durch den Vermerk n.b. (nicht bestimmt) verdeutlicht wird.

Tabelle: Erhaltene 19-Dechlor-20-chlor-ansamitocin-Derivate **39a-h**.

DERIVAT	ISOLIERT	AUSBEUTE	
		<i>Fermentation</i>	<i>Mutasynthon</i>
39a	HRMS	-	-
39b	3.7 mg (7.3 μ mol)	3.9 mg/L	0.62 %
39c	1.8 mg (3.1 μ mol)	1.9 mg/L	0.26 %
39d	0.3 mg (0.5 μ mol)	0.3 mg/L	0.04 %
39e	0.6 mg (1.0 μ mol)	0.6 mg/L	0.09 %
39f	0.9 mg (2.0 μ mol)	1.0 mg/L	0.17 %
39g	0.5 mg (1.1 μ mol)	0.5 mg/L	0.09 %
39h	1.8 mg (3.7 μ mol)	1.9 mg/L	0.31 %

20-Chlorproansamitocin **39a**:

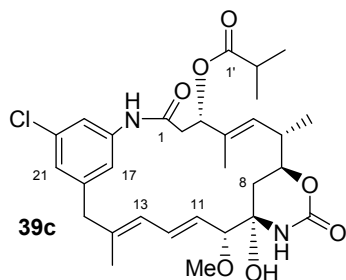
UPLC-MS [MeCN] t_R = 2.11 min; **HRMS** [ESI] m/z für $C_{25}H_{32}ClNO_5Na$ $[M+Na]^+$: ber. 484.1867, gef. 484.1872.

7-*O*-Carbamoyl-20-chlorproansamitocin **39b**:

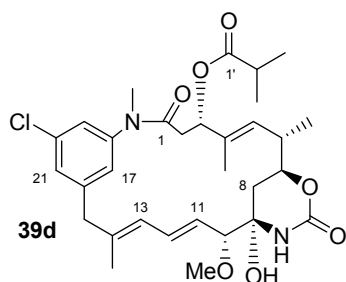
1H -NMR (500 MHz, Methanol- d_4 , CHD_2OD = 3.31 ppm): δ 8.02 (s, 1H, 17-H), 6.95 (s, 1H, 21-H), 6.88 (dd, J = 1.9, 1.9 Hz, 1H, 19-H), 6.64 (dd, J = 15.2, 11.0 Hz, 1H, 12-H), 6.11 (d, J = 11.0 Hz, 1H, 13-H), 5.58 (dd, J = 15.2, 9.3 Hz, 1H, 11-H), 5.45 (d, J = 8.6 Hz, 1H, 5-H), 4.30 (ddd, J = 12.0, 10.1, 1.8 Hz, 1H, 7-H), 4.21 (bd, J = 6.5 Hz, 1H, 3-H), 3.57 (d, J = 9.3 Hz, 1H, 10-H), 3.43 (d, J = 14.0 Hz, 1H, 15- H_a), 3.34 (s, 3H, 10-OMe), 3.19 (d, J = 14.0 Hz, 1H, 15- H_b), 2.83 (dd, J = 15.5, 2.8 Hz, 1H, 2- H_a), 2.73 (dd, J = 15.5, 6.5 Hz, 1H, 2- H_b), 2.65 (ddq, J = 10.1, 8.6, 6.5 Hz, 1H, 6-H), 1.96 (dd, J = 14.2, 1.8 Hz, 1H, 8- H_a), 1.69 (s, 3H, 14-Me), 1.65 (s, 3H, 4-Me), 1.43 (dd, J = 14.2, 12.0 Hz, 1H, 8- H_b), 1.14 (d, J = 6.5 Hz, 3H, 6-Me) ppm; **^{13}C -NMR** (125 MHz, Methanol- d_4 , Methanol- d_4 = 49.00 ppm): δ 171.5 (s, C-1), 156.0 (s, 7-OCONH), 144.4 (s, C-16), 141.4 (s, C-18), 140.1 (s, C-14), 138.9 (s, C-4), 134.8

(d, C-12), 134.6 (s, C-20), 128.4 (d, C-13), 127.2 (d, C-11), 125.5 (d, C-5), 125.2 (d, C-21), 118.6 (d, C-17), 117.5 (d, C-19), 89.1 (d, C-10), 82.4 (s, C-9), 79.7 (d, C-7), 73.1 (d, C-3), 56.4 (q, 10-OMe), 46.3 (t, C-15), 41.0 (t, C-2), 38.4 (d, C-6), 36.1 (t, C-8), 18.0 (q, 6-Me), 16.8 (q, 14-Me), 15.0 (q, 4-Me) ppm; **UPLC-MS** [MeCN] $t_R = 1.95$ min; **HRMS** [ESI] m/z für $C_{26}H_{34}ClN_2O_6$ $[M+H]^+$: ber. 505.2105, gef. 505.2103.

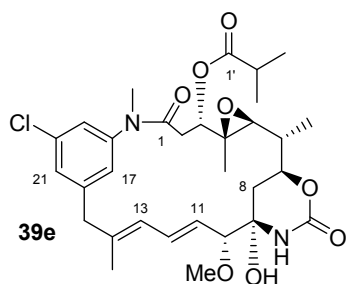
3-*O*-Isobutyryl-7-*O*-carbamoyl-20-chloroproansamitocin **39c**:



1H -NMR (500 MHz, Methanol- d_4 , $CHD_2OD = 3.31$ ppm): δ 8.06 (s, 1H, 17-H), 6.96 (s, 1H, 21-H), 6.85 (s, 1H, 19-H), 6.68 (dd, $J = 15.4, 10.8$ Hz, 1H, 12-H), 6.10 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, 13-H), 5.60 (dd, $J = 15.4, 9.3$ Hz, 1H, 11-H), 5.33-5.30 (m, 1H, 3-H), 5.28 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H, 5-H), 4.28 (ddd, $J = 11.6, 10.8, 0.9$ Hz, 1H, 7-H), 3.60 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H, 10-H), 3.42 (d, $J = 14.2$ Hz, 1H, 15- H_a), 3.35 (s, 3H, 10-OMe), 3.25 (d, $J = 14.2$ Hz, 1H, 15- H_b), 2.88 (dd, $J = 14.5, 2.8$ Hz, 1H, 2- H_a), 2.71 (dd, $J = 14.5, 7.9$ Hz, 1H, 2- H_b), 2.69-2.63 (m, 1H, 6-H), 2.61 (qq, $J = 6.9, 6.9$ Hz, 1H, 2'-H), 1.98 (dd, $J = 14.0, 0.9$ Hz, 1H, 8- H_a), 1.74 (s, 3H, 14-Me), 1.71 (s, 3H, 4-Me), 1.48 (dd, $J = 14.0, 11.6$ Hz, 1H, 8- H_b), 1.17 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, 2'- Me_a), 1.16 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, 2'- Me_b), 1.09 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, 6-Me) ppm; **^{13}C -NMR** (125 MHz, Methanol- d_4 , Methanol- $d_4 = 49.00$ ppm): δ 177.6 (s, C-1'), 169.5 (s, C-1), 155.8 (s, 7-CONH), 144.4 (s, C-16), 141.3 (s, C-18), 139.5 (s, C-14), 135.9 (s, C-4), 134.7 (s, C-20), 134.4 (d, C-12), 129.1 (d, C-13), 127.2 (d, C-11), 126.2 (d, C-5), 125.3 (d, C-21), 118.7 (d, C-17), 117.5 (d, C-19), 88.8 (d, C-10), 82.4 (s, C-9), 79.3 (d, C-7), 74.2 (d, C-3), 56.5 (q, 10-OMe), 45.8 (t, C-15), 40.3 (t, C-2), 38.8 (d, C-6), 36.1 (t, C-8), 35.2 (d, C-2'), 19.40 (q, 2'- Me_a), 19.39 (q, 2'- Me_b), 18.1 (q, 6-Me), 17.0 (q, 14-Me), 15.9 (q, 4-Me) ppm; **UPLC-MS** [MeCN] $t_R = 2.31$ min; **HRMS** [ESI] m/z für $C_{30}H_{40}ClN_2O_7$ $[M+H]^+$: ber. 575.2524, gef. 575.2526.

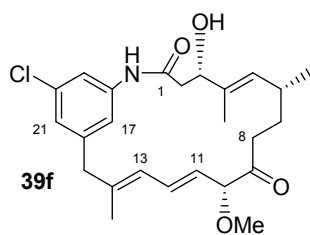
4,5-Deepoxy-19-dechlor-20-chloransamitocin P-3 **39d**:

¹H-NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 7.36 (dd, *J* = 1.9, 1.9 Hz, 1H, 21-H), 7.31 (dd, *J* = 1.9, 1.9 Hz, 1H, 19-H), 7.19 (dd, *J* = 1.9, 1.9 Hz, 1H, 17-H), 6.57 (dd, *J* = 15.2, 11.2 Hz, 1H, 12-H), 5.92 (bm, 1H, 13-H), 5.42 (dd, *J* = 15.2, 8.9 Hz, 1H, 11-H), 5.38 (dd, *J* = 11.6, 2.1 Hz, 1H, 3-H), 5.14 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H, 5-H), 4.04 (ddd, *J* = 12.0, 9.8, 2.2 Hz, 1H, 7-H), 3.56 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, 10-H), 3.48 (d, *J* = 14.0 Hz, 1H, 15-H_a), 3.34 (s, 3H, 10-OMe), 3.29 (d, *J* = 14.0 Hz, 1H, 15-H_b), 3.21 (s, 3H, *N*-Me), 2.59 (qq, *J* = 7.0, 6.9 Hz, 1H, 2'-H), 2.56-2.48 (m, 1H, 6-H), 2.52 (dd, *J* = 14.9, 2.1 Hz, 1H, 2-H_a), 2.35 (dd, *J* = 14.9, 11.6 Hz, 1H, 2-H_b), 1.84 (d, *J* = 0.7 Hz, 3H, 14-Me), 1.52 (dd, *J* = 14.1, 2.2 Hz, 1H, 8-H_a), 1.35 (dd, *J* = 14.1, 12.0 Hz, 1H, 8-H_b), 1.35 (s, 3H, 4-Me), 1.18 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, 2'-Me_a), 1.17 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, 2'-Me_b), 1.07 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, 6-Me) ppm; **¹³C-NMR** (125 MHz, Methanol-*d*₄, Methanol-*d*₄ = 49.00 ppm): δ 177.40 (s, C-1'), 171.47 (s, C-1), 155.79 (s, 7-CONH), 146.34 (s, C-18), 145.49 (s, C-16), 141.09 (s, C-14), 136.65 (s, C-4), 136.08 (s, C-20), 134.04 (d, C-12), 129.99 (d, C-21), 128.92 (d, C-5), 128.90 (d, C-11), 128.03 (d, C-17), 126.36 (d, C-13), 126.05 (d, C-19), 89.19 (d, C-10), 81.90 (s, C-9), 78.54 (d, C-7), 74.89 (d, C-3), 56.93 (q, 10-OMe), 46.02 (t, C-15), 38.59 (d, C-6), 38.48 (t, C-2), 38.02 (q, *N*-Me), 36.44 (t, C-8), 35.28 (d, C-2'), 19.64 (q, 2'-Me_a), 19.29 (q, 2'-Me_b), 17.20 (q, 14-Me), 17.11 (q, 6-Me), 14.75 (q, 4-Me) ppm; **UPLC-MS** [MeCN] *t*_R = 2.40 min; **HRMS** [ESI] *m/z* für C₃₁H₄₂ClN₂O₇ [M+H]⁺: ber. 589.2681, gef. 589.2686.

19-Dechlor-20-chloransamitocin P-3 **39e**:

¹H-NMR (500 MHz, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 7.42 (dd, *J* = 1.8, 1.8 Hz, 1H, 21-H), 7.34 (dd, *J* = 1.8, 1.8 Hz, 1H, 19-H), 7.20 (dd, *J* = 1.8, 1.8 Hz, 1H, 17-H), 6.64 (dd, *J* = 15.4, 11.1 Hz, 1H, 12-H), 6.28 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H, 13-H), 5.55 (dd, *J* = 15.4, 8.9 Hz, 1H, 11-H), 4.74 (dd, *J* = 12.0, 2.9 Hz, 1H, 3-H), 4.22 (ddd, *J* = 11.5, 10.6, 2.9 Hz, 1H, 7-H), 3.58 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, 10-H), 3.57 (d, *J* = 12.9 Hz, 1H, 15-H_a), 3.36 (s, 3H, 10-OMe), 3.34 (d, *J* = 12.9 Hz, 1H, 15-H_b), 3.20 (s, 3H, *N*-Me), 2.84 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H, 5-H), 2.76 (dd, *J* = 14.3, 12.0 Hz, 1H, 2-H_a), 2.73 (qq, *J* = 7.1, 6.7 Hz, 1H, 2'-H), 2.22 (dd, *J* = 14.3, 2.9 Hz, 1H, 2-H_b), 1.71 (s, 3H, 14-Me), 1.60-1.50 (m, 1H, 6-H), 1.59 (dd, *J* = 13.8, 2.9 Hz, 1H, 8-H_a), 1.54 (dd, *J* = 13.8, 11.5 Hz, 1H, 8-H_b), 1.26 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H, 2'-Me_a), 1.24 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, 6-Me), 1.21 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, 2'-Me_b), 0.92 (s, 3H, 4-Me) ppm; **¹³C-NMR** (125 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.00 ppm): δ 177.7 (s, C-1'), 171.1 (s, C-1), 155.3 (s, 7-OCONH), 146.4 (s, C-18), 145.4 (s, C-16), 140.6 (s, C-14), 136.3 (s, C-20), 134.0 (d, C-12), 130.5 (d, C-21), 129.9 (d, C-11), 128.1 (d, C-17), 126.7 (d, C-13), 126.6 (d, C-19), 89.8 (d, C-10), 81.7 (s, C-9), 77.9 (d, C-3), 75.9 (d, C-7), 67.7 (d, C-5), 61.9 (s, C-4), 57.0 (q, 10-OMe), 47.2 (t, C-15), 39.7 (d, C-6), 37.9 (q, *N*-Me), 37.6 (t, C-8), 35.0 (d, C-2'), 34.4 (t, C-2), 20.7 (q, 2'-Me_a), 18.4 (q, 2'-Me_b), 15.9 (q, 14-Me), 14.8 (q, 6-Me), 12.9 (q, 4-Me) ppm; **UPLC-MS** [MeCN] *t_R* = 2.20 min; **HRMS** [ESI] *m/z* für C₃₁H₄₂ClN₂O₈ [M+H]⁺: ber. 605.2630, gef. 605.2632.

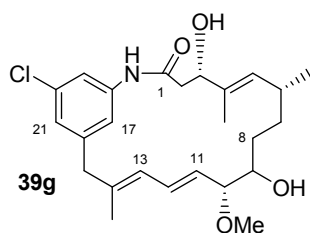
7-Desoxy-20-chlorproansamitocin **39f**:



¹H-NMR (500 MHz, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 7.38 (dd, *J* = 1.7, 1.7 Hz, 1H, 17-H), 7.09 (dd, *J* = 1.7, 1.7 Hz, 1H, 19-H), 7 (dd, *J* = 1.7, 1.7 Hz, 1H, 21-H), 6.81 (dd, *J* = 15.1, 11.2 Hz, 1H, 12-H), 6.07 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H, 13-H), 5.37 (dd, *J* = 15.1, 7.8 Hz, 1H, 11-H), 5.09 (dq, *J* = 8.4, 1.2 Hz, 1H, 5-H), 4.47 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, 10-H), 4.32 (dd, *J* = 10.3, 4.7 Hz, 1H, 3-H), 3.36 (d, *J* = 13.4 Hz, 1H, 15-H_a), 3.32 (s, 3H, 10-OMe), 3.21 (d, *J* = 13.4 Hz, 1H, 15-H_b), 2.62 (dd, *J* = 12.5, 4.7 Hz, 1H, 2-H_a), 2.62-2.55 (m, 1H, 8-H_a), 2.56 (dd, *J* = 12.5, 10.3 Hz, 1H, 2-H_b), 2.31 (ddd, *J* = 16.0, 6.0, 5.8 Hz, 1H, 8-H_b), 2.00-1.95 (m, 1H, 6-H), 1.86-1.77 (m, 1H, 7-H_a), 1.71 (s, 3H, 14-Me), 1.63 (d, *J* = 1.2 Hz, 3H, 4-Me), 1.23-1.15 (m, 1H, 7-H_b), 0.48 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, 6-Me) ppm; **¹³C-NMR** (125 MHz, Methanol-d₄,

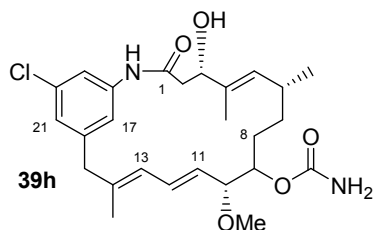
Methanol- d_4 = 49.00 ppm): δ 209.7 (s, C-9), 171.0 (s, C-1), 143.6 (s, C-16), 141.4 (s, C-14), n.b. (s, C-18), 135.2 (s, C-4), 134.5 (s, C-20), 134.0 (d, C-5), 133.3 (d, C-12), 126.5 (d, C-13), 126.1 (d, C-11), 125.5 (d, C-21), 119.8 (d, C-19), 119.6 (d, C-17), 88.8 (d, C-10), 75.7 (d, C-3), 56.7 (q, 10-OMe), 46.3 (t, C-15), 44.2 (t, C-2), 36.2 (t, C-8), 32.1 (t, C-7), 31.5 (d, C-6), 19.4 (q, 6-Me), 16.3 (q, 14-Me), 11.4 (q, 4-Me) ppm; **UPLC-MS** [MeCN] t_R = 2.04 min; **HRMS** [ESI] m/z für $C_{25}H_{33}ClNO_4$ $[M+H]^+$: ber. 446.2098, gef. 446.2102.

7-Desoxy-9-hydro-20-chlorproansamitocin **39g**:



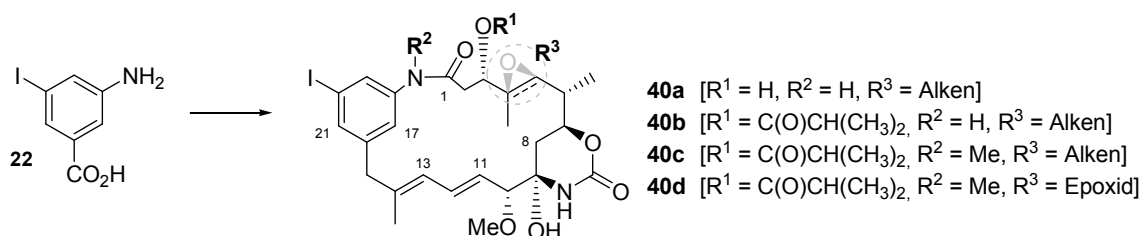
1H -NMR (500 MHz, Methanol- d_4 , CHD_2OD = 3.31 ppm): δ 7.66 (s, 1H, 17-H), 7.00 (s, 1H, 19-H), 6.97 (s, 1H, 21-H), 6.51 (dd, J = 15.1, 10.8 Hz, 1H, 12-H), 6.01 (d, J = 10.8 Hz, 1H, 13-H), 5.42 (dd, J = 15.1, 7.0 Hz, 1H, 11-H), 5.36 (d, J = 8.3 Hz, 1H, 5-H), 4.32 (dd, J = 5.9, 5.9 Hz, 1H, 3-H), 3.45-3.40 (m, 1H, 10-H), 3.44-3.41 (m, 1H, 9-H), 3.37 (d, J = 14.4 Hz, 1H, 15- H_a), 3.30 (s, 3H, 10-OMe), 3.27 (d, J = 14.4 Hz, 1H, 15- H_b), 2.68 (d, J = 5.9 Hz, 2H, 2a & 2b), 2.38-2.28 (m, 1H, 6-H), 1.73 (s, 3H, 14-Me), 1.64 (s, 3H, 4-Me), 1.56-1.50 (m, 1H, 7- H_a), 1.53-1.48 (m, 1H, 8- H_a), 1.37-1.28 (m, 1H, 7- H_b), 1.28-1.20 (m, 1H, 8- H_b), 0.83 (d, J = 6.7 Hz, 3H, 6-Me) ppm; **^{13}C -NMR** (125 MHz, Methanol- d_4 , Methanol- d_4 = 49.00 ppm): δ 171.6 (s, C-1), 144.3 (s, C-16), 140.9 (s, C-18), 139.1 (s, C-14), 135.6 (s, C-4), 134.6 (s, C-20), 132.9 (d, C-5), 131.9 (d, C-12), 129.9 (d, C-11), 128.2 (d, C-13), 125.6 (d, C-21), 120.0 (d, C-17), 118.6 (d, C-19), 88.6 (d, C-10), 76.0 (d, C-9), 74.3 (d, C-3), 56.6 (q, 10-OMe), 46.1 (t, C-15), 42.6 (t, 2a & 2b), 34.6 (t, C-7), 33.3 (d, C-6), 31.6 (t, C-8), 21.3 (q, 6-Me), 16.9 (q, 14-Me), 13.3 (q, 4-Me) ppm; **UPLC-MS** [MeCN] t_R = 2.18 min; **HRMS** [ESI] m/z für $C_{25}H_{34}ClNO_4Na$ $[M+Na]^+$: ber. 470.2074, gef. 470.2077.

7-Desoxy-9-hydro-9-*O*-carbamoyl-20-chlorproansamitocin **39h**:



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Methanol- d_4 , $\text{CHD}_2\text{OD} = 3.31$ ppm): δ 7.65 (s, 1H, 17-H), 7.02 (s, 1H, 19-H), 7.00 (s, 1H, 21-H), 6.56 (dd, $J = 15.1, 10.8$ Hz, 1H, 12-H), 6.04 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, 13-H), 5.51 (dd, $J = 15.1, 7.3$ Hz, 1H, 11-H), 5.35 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, 5-H), 4.71 (ddd, $J = 7.2, 5.7, 5.5$ Hz, 1H, 9-H), 4.37 (dd, $J = 6.7, 5.8$ Hz, 1H, 3-H), 3.71 (dd, $J = 7.3, 7.2$ Hz, 1H, 10-H), 3.36 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, 15- H_a), 3.31 (s, 3H, 10-OMe), 3.32 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, 15- H_b), 2.69 (d, $J = 5.8$ Hz, 1H, 2- H_a), 2.69 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H, 2- H_b), 2.36-2.26 (m, 1H, 6-H), 1.74 (s, 3H, 14-Me), 1.66 (s, 3H, 4-Me), 1.64-1.54 (m, 1H, 8- H_a), 1.46-1.36 (m, 1H, 8- H_b), 1.41-1.32 (m, 2H, 7-H), 0.81 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, 6-Me) ppm; **$^{13}\text{C-NMR}$** (125 MHz, Methanol- d_4 , Methanol- $\text{d}_4 = 49.00$ ppm): δ 171.5 (s, C-1), 160.0 (s, 9- OCONH_2), 144.2 (s, C-16), 140.9 (s, C-18), 139.3 (s, C-14), 135.8 (s, C-4), 134.6 (s, C-20), 133.1 (d, C-5), 131.3 (d, C-12), 129.3 (d, C-11), 127.9 (d, C-13), 125.8 (d, C-21), 120.3 (d, C-17), 118.9 (d, C-19), 85.3 (d, C-10), 77.4 (d, C-9), 74.6 (d, C-3), 56.9 (q, 10-OMe), 46.2 (t, C-15), 43.0 (t, C-2), 33.7 (t, C-7), 33.0 (d, C-6), 29.1 (t, C-8), 20.8 (q, 6-Me), 16.8 (q, 14-Me), 12.8 (q, 4-Me) ppm; **UPLC-MS** [MeCN] $t_R = 2.13$ min; **HRMS** [ESI] m/z für $\text{C}_{26}\text{H}_{35}\text{ClN}_2\text{O}_5\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: ber. 513.2132, gef. 513.2132.

19-Dechlor-20-iodansamitocin-Derivate 40a-d



Die mutasynthetische Darstellung der 19-Dechloro-20-iod-ansamitocin-Derivate erfolgte unter Supplementierung des Mutasynthons **22** zu Kulturen von *A. pretiosum* HGF073 entsprechend des unter 6.5 beschriebenen allgemeinen Fermentationsprotokolls für Mutasynthesen mit kontinuierlicher Mutasynthon-Zugabe durch Spritzenpumpensysteme. Es wurden $141 \mu\text{mol}$ (37 mg, 3.1 mmol/L) der Aminobenzoesäure **22** (gelöst in DMSO) zu einer Kultur (45 mL) supplementiert, wobei nach extraktiver Aufarbeitung vier Derivate im konzentrierten Rohextrakt (1 mL, in MeOH) massenspektrometrisch detektiert wurden (*vide infra*).

7-*O*-Carbamoyl-20-iodoproansamitocin **40a**:

UPLC-MS [MeOH] t_R = 2.54 min; **HRMS** [ESI] m/z für $C_{26}H_{34}IN_2O_6$ $[M+H]^+$: ber. 597.1462, gef. 597.1454; **MSMS** {597.2 $[M+H]^+$ }: 535.2 $[M-CO_2-H_2O+H]^+$, 517.1 $[M-CO_2-2H_2O+H]^+$, 503.1 $[M-CO_2-H_2O-MeOH+H]^+$, 485.1 $[M-CO_2-2H_2O-MeOH+H]^+$.

3-*O*-Isobutyryl-7-*O*-carbamoyl-20-iodoproansamitocin **40b**:

UPLC-MS [MeOH] t_R = 2.67 min; **HRMS** [ESI] m/z für $C_{30}H_{39}IN_2O_7Na$ $[M+Na]^+$: ber. 689.1700, gef. 689.1707; **MSMS** {689.2 $[M+Na]^+$ }: 601.1 $[M-HOC(O)CH(CH_3)_2+Na]^+$, 557.1 $[M-HOC(O)CH(CH_3)_2-CO_2+Na]^+$, 539.1 $[M-HOC(O)CH(CH_3)_2-CO_2-H_2O+Na]^+$.

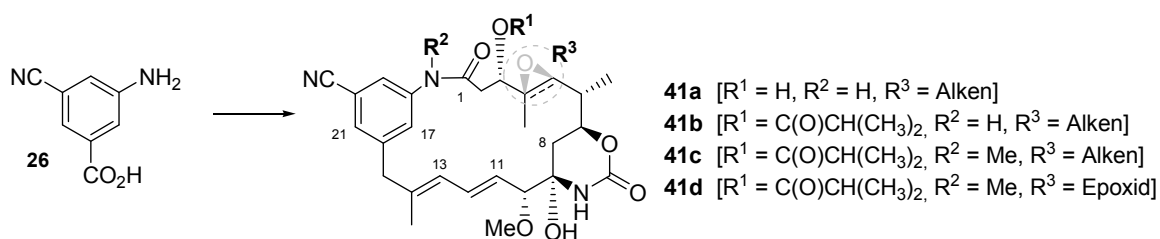
4,5-Deepoxy-19-dechlor-20-iodansamitocin P-3 **40c**:

UPLC-MS [MeOH] t_R = 2.62 min; **HRMS** [ESI] m/z für $C_{31}H_{42}IN_2O_7$ $[M+H]^+$: ber. 681.2037, gef. 681.2032; **MSMS** {703.2 $[M+Na]^+$ }: 615.2 $[M-HOC(O)CH(CH_3)_2+Na]^+$, 571.2 $[M-HOC(O)CH(CH_3)_2-CO_2+Na]^+$, 553.1 $[M-HOC(O)CH(CH_3)_2-CO_2-H_2O+Na]^+$.

19-Dechlor-20-iodansamitocin P-3 **40d**:

UPLC-MS [MeOH] t_R = 2.57 min; **HRMS** [ESI] m/z für $C_{31}H_{42}IN_2O_8$ $[M+H]^+$: ber. 697.1986, gef. 697.1991; **MSMS** {697.2 $[M+H]^+$ }: 609.1 $[M-HOC(O)CH(CH_3)_2+H]^+$, 577.1 $[M-HOC(O)CH(CH_3)_2-MeOH+H]^+$.

19-Dechlor-20-cyano-ansamitocin-Derivate **41a-d**



Die mutasynthetische Darstellung der 19-Dechloro-20-cyano-ansamitocin-Derivate erfolgte unter Supplementierung des Mutasynthons **26** zu Kulturen von *A. pretiosum* HGF073 entsprechend des unter 6.5 beschriebenen allgemeinen Fermentationsprotokolls für Mutasynthesen mit kontinuierlicher Mutasynthon-Zugabe durch Spritzenpumpensysteme. Es wurden 226 μmol (36.4 mg, 5 mmol/L) der Aminbenzoesäure **26** (gelöst in DMSO:Wasser = 1:1) zu einer Kultur (45 mL) supplementiert, wobei nach extraktiver Aufarbeitung vier Derivate im konzentrierten und über Kieselgel filtrierten Rohextrakt (1 mL, in MeOH) massenspektrometrisch detektiert wurden (*vide infra*).

7-*O*-Carbamoyl-20-cyanoproansamitocin 41a:

UPLC-MS [MeOH] t_R = 2.25 min; **HRMS** [ESI] m/z für $C_{27}H_{34}N_3O_6$ $[M+H]^+$: ber. 496.2448, gef. 496.2444; **MSMS** {496.2 $[M+H]^+$ }: 434.2 $[M-CO_2-H_2O+H]^+$, 416.2 $[M-CO_2-2H_2O+H]^+$, 402.2 $[M-CO_2-H_2O-MeOH+H]^+$, 384.2 $[M-CO_2-2H_2O-MeOH+H]^+$.

3-*O*-Isobutyryl-7-*O*-carbamoyl-20-cyanoproansamitocin 41b:

UPLC-MS [MeOH] t_R = 2.45 min; **HRMS** [ESI] m/z für $C_{31}H_{40}N_3O_7$ $[M+H]^+$: ber. 566.2866, gef. 566.2867; **MSMS** {566.3 $[M+H]^+$ }: 504.3 $[M-CO_2-H_2O+H]^+$, 478.2 $[M-HOC(O)CH(CH_3)_2+H]^+$, 416.2 $[M-HOC(O)CH(CH_3)_2-CO_2-H_2O+H]^+$, 384.2 $[M-HOC(O)CH(CH_3)_2-CO_2-H_2O-MeOH+H]^+$.

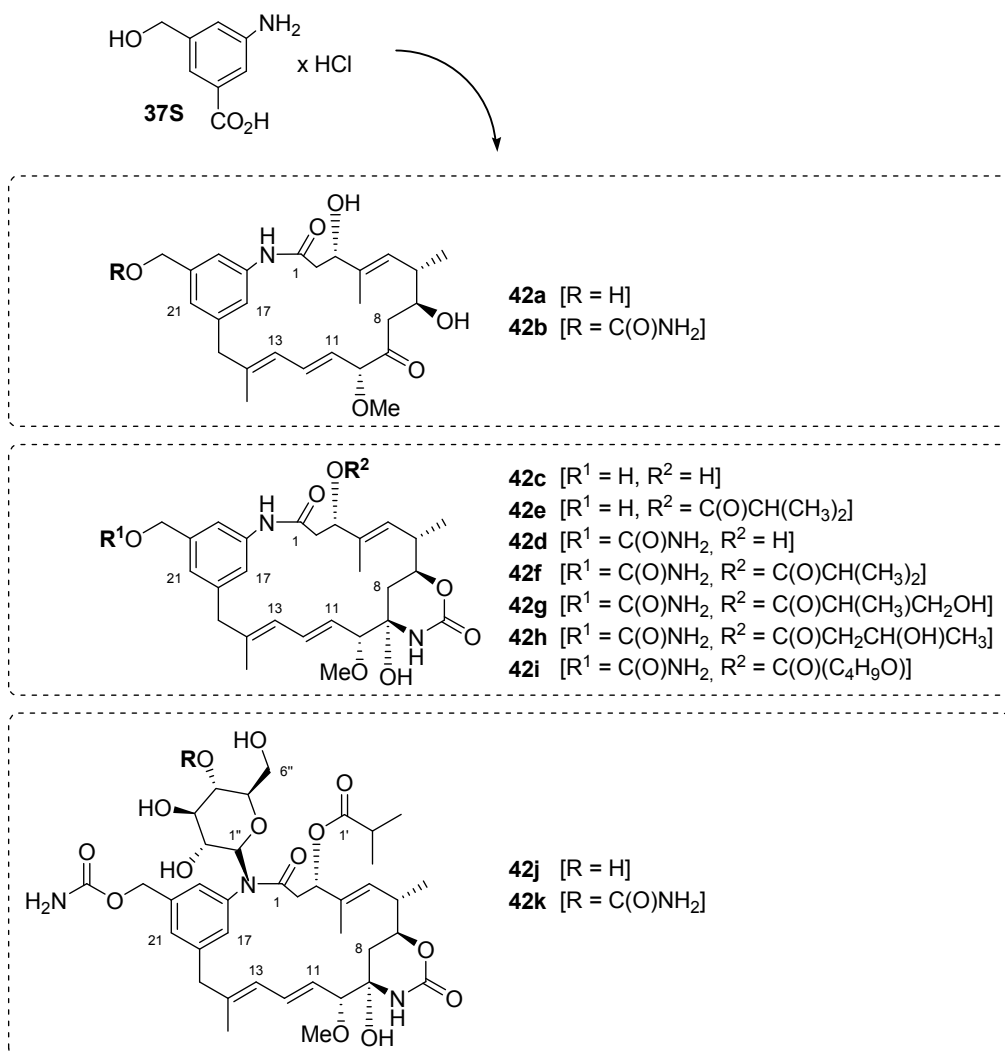
4,5-Deepoxy-19-dechlor-20-cyanoansamitocin P-3 41c:

UPLC-MS [MeOH] t_R = 2.30 min; **HRMS** [ESI] m/z für $C_{32}H_{42}N_3O_7$ $[M+H]^+$: ber. 580.3023, gef. 580.3027; **MSMS** {580.3 $[M+H]^+$ }: 518.3 $[M-CO_2-H_2O+H]^+$, 492.2 $[M-HOC(O)CH(CH_3)_2+H]^+$, 430.2 $[M-HOC(O)CH(CH_3)_2-CO_2-H_2O+H]^+$, 398.2 $[M-HOC(O)CH(CH_3)_2-CO_2-H_2O-MeOH+H]^+$.

19-Dechlor-20-cyanoansamitocin P-3 41d:

UPLC-MS [MeOH] t_R = 2.21 min; **HRMS** [ESI] m/z für $C_{32}H_{42}N_3O_8$ $[M+H]^+$: ber. 596.2972, gef. 596.2975; **MSMS** {596.3 $[M+H]^+$ }: 508.2 $[M-HOC(O)CH(CH_3)_2+H]^+$, 446.2 $[M-HOC(O)CH(CH_3)_2-CO_2-H_2O+H]^+$, 414.2 $[M-HOC(O)CH(CH_3)_2-CO_2-H_2O-MeOH+H]^+$.

19-Dechlor-20-hydroxymethylansamitocin-Derivate 42a-k



Die mutasynthetische Darstellung der 19-Dechlor-20-hydroxymethylansamitocin-Derivate erfolgte unter Supplementierung des Mutasynthons **37S** zu Kulturen von *A. pretiosum* HGF073 entsprechend des unter 6.5 beschriebenen allgemeinen Fermentationsprotokolls für Mutasynthesen mit kontinuierlicher Mutasynthon-Zugabe durch Spritzenpumpensysteme, gefolgt von extraktiver Aufarbeitung. In der Summe wurden 1.77 mmol (360 mg) des Aminobenzoesäure-Hydrochlorids **37S** (gelöst in Wasser) zu insgesamt 1.32 L Fermentationsansätzen supplementiert (360 mL mit 1.56 mmol/L, 960 mL mit 1.25 mmol/L). Die vereinigten Rohextrakte wurden der in tabellarisch aufgeführten chromatographischen Reinigung unterzogen (*vide supra*), die massenspektrometrisch verfolgt wurde.

Tabelle: Chromatographische Reinigung der Ansamitocin-Derivate **42a-k**.

PROBE	SYSTEM (KAP. 6.1)	ELUTIONSBEDINGUNGEN	FRAKTIONEN
Rohextrakt	SiO ₂	PE:EE 4:1 → EE	F-1 (R _f (EE) 0.5-0.2) F-2 (R _f (EE) < 0.2)
F-1	C18-SP	H ₂ O:MeOH [A:B], Flussrate = 2.0 mL/min Gradient (t [min]/B [%]): (0/20) (5/20) (25/60) (60/80)	F-3 (t _R = 47.0-48.0 min)
F-3	CN-SP	H ₂ O:MeCN [A:B], Flussrate = 2.5 mL/min Gradient (t [min]/B [%]): (0/5) (5/5) (45/30) (55/35) (90/50)	42e (t _R = 53.8 min) 42f (t _R = 57.7 min)
F-2	C18-P _[A]	H ₂ O:MeOH [A:B], Flussrate = 4.5 mL/min Gradient (t [min]/B [%]): (0/10) (20/10) (140/90)	F-4 (t _R = 110.0-131.0 min)
F-4	Sephadex LH-20	MeOH	F-5 (M _R = 700-1000 Da) F-6 (M _R = 400-700 Da)
F-5	C18-SP	H ₂ O:MeCN [A:B], Flussrate = 2.5 mL/min Gradient (t [min]/B [%]): (0/5) (5/5) (45/18) (80/35) (90/50)	F-7 (t _R = 75.0-77.0 min) F-8 (t _R = 77.0-79.0 min)
F-6	C18-SP	H ₂ O:MeCN [A:B], Flussrate = 2.5 mL/min Gradient (t [min]/B [%]): (0/5) (5/5) (45/18) (80/35) (90/50) (90.1/100) (100/100)	F-9 (t _R = 59.0-62.0 min & 76.0-79.0 min) F-10 (t _R = 64.0-66.0 min & 79.0-83.0 min) F-11 (t _R = 68.0-71.0 min & 83.0-85.0 min) F-12 (t _R = 71.0-73.0 min & 86.0-88.0 min) F-13 (t _R = 73.0-76.0 min & 88.0-91.0 min)
F-7	CN-SP	H ₂ O:MeCN [A:B], Flussrate = 2.5 mL/min Gradient (t [min]/B [%]): (0/5) (5/5) (45/12) (80/28) (95/50)	42j (t _R = 74.0 min)
F-8	CN-SP	H ₂ O:MeCN [A:B], Flussrate = 2.5 mL/min Gradient (t [min]/B [%]): (0/5) (5/5) (45/12) (80/28) (95/50)	42k (t _R = 75.0 min)
F-9	CN-SP	H ₂ O:MeCN [A:B], Flussrate = 2.5 mL/min Gradient (t [min]/B [%]): (0/5) (5/5) (45/12) (80/28) (95/50)	42k (t _R = 75.0 min)
F-10	CN-SP	H ₂ O:MeCN [A:B], Flussrate = 2.5 mL/min Gradient (t [min]/B [%]): (0/5) (5/5) (45/12) (80/28) (95/50)	42c (t _R = 71.5 min)
F-11	CN-SP	H ₂ O:MeCN [A:B], Flussrate = 2.5 mL/min Gradient (t [min]/B [%]): (0/5) (5/5) (45/18) (80/35)	42a (t _R = 33.5 min) 42d (t _R = 63.5 min)
F-12	CN-SP	H ₂ O:MeCN [A:B], Flussrate = 2.5 mL/min Gradient (t [min]/B [%]): (0/5) (5/5) (45/12) (80/28) (95/50)	42g & 42h (t _R = 83.0 min)
F-13	CN-SP	H ₂ O:MeCN [A:B], Flussrate = 2.5 mL/min Gradient (t [min]/B [%]): (0/5) (5/5) (45/12) (80/28) (95/50)	42b (t _R = 55.0 min) 42i (t _R = 85.0 min)

Die tabellarisch aufgeführten Derivate konnten als farblose Feststoffe erhalten oder massenspektrometrisch charakterisiert werden (*vide infra*). Insgesamt konnten 15.6 µmol Ansamitocin-Derivate in einer Ausbeute von 0.9 % isoliert werden.

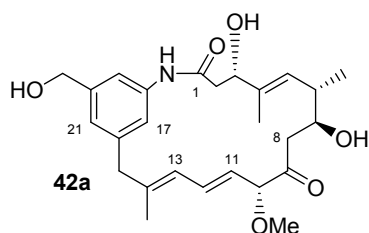
Die 3-*O*-Acyl-isomeren Derivate **42g** und **42h** wurden als untrennbares Gemisch im Verhältnis 3:2 (bestimmt durch ^1H -NMR-Integration) erhalten.

Tabelle: Erhaltene 19-Dechlor-20-hydroxymethylansamitocin-Derivate **42a-k**.

DERIVAT	ISOLIERT	AUSBEUTE	
		<i>Fermentation</i>	<i>Mutasynton</i>
42a	3.0 mg (6.6 μmol)	2.3 mg/L	0.37 %
42b	1.5 mg (3.0 μmol)	1.1 mg/L	0.17 %
42c	0.5 mg (1.0 μmol)	0.4 mg/L	0.06 %
42d	1.2 mg (2.2 μmol)	0.9 mg/L	0.12 %
42e	HRMS	-	-
42f	0.7 mg (1.1 μmol)	0.5 mg/L	0.06 %
42g/h	0.4 mg (0.6 μmol)	0.3 mg/L	0.03 %
42i	HRMS	-	-
42j	0.4 mg (0.5 μmol)	0.3 mg/L	0.03 %
42k	1.0 mg (1.2 μmol)	0.8 mg/L	0.07 %

Die Zuordnung der ^{13}C -Signale basiert für die Derivate **42c** und **42j**, sowie für das Gemisch aus **42g** und **42h** ausschließlich auf entsprechenden HSQC- und HMBC-Experimenten. Aufgrund dieser Datenbasis konnte dem urethanischen Kohlenstoff des jeweiligen zyklischen 7-*O*-Carbinolamids kein Signal zugewiesen werden, welches in der nachfolgenden Niederschrift durch den Vermerk *n.b.* (nicht bestimmt) verdeutlicht wird. Für die Derivate **42g/h** gilt selbiges auch für das Signal des quartären, aromatischen Kohlenstoffs C-18.

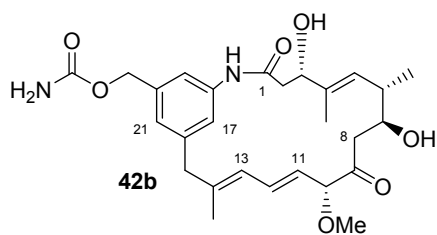
20-Hydroxymethylproansamitocin **42a**:



^1H -NMR (500 MHz, Methanol- d_4 , CHD_2OD = 3.31 ppm): δ 7.27 (dd, J = 1.8, 1.8 Hz, 1H, 17-H), 7.21 (dd, J = 1.8, 1.8 Hz, 1H, 19-H), 6.96 (dd, J = 1.8, 1.8 Hz, 1H, 21-H), 6.83 (ddd,

$J = 15.2, 11.0, 0.9$ Hz, 1H, 12-H), 6.08 (dq, $J = 11.0, 1.2$ Hz, 1H, 13-H), 5.37 (dd, $J = 15.2, 8.6$ Hz, 1H, 11-H), 5.28 (ddq, $J = 9.3, 1.2, 1.2$ Hz, 1H, 5-H), 4.56 (s, 2H, 20-CH₂OH), 4.50 (dd, $J = 8.6, 0.9$ Hz, 1H, 10-H), 4.34 (ddd, $J = 9.9, 4.4, 1.2$ Hz, 1H, 3-H), 4.04 (ddd, $J = 7.2, 6.1, 5.0$ Hz, 1H, 7-H), 3.40 (d, $J = 13.5$ Hz, 1H, 15-H_a), 3.33 (s, 3H, 10-OMe), 3.23 (d, $J = 13.5$ Hz, 1H, 15-H_b), 2.88 (dd, $J = 16.2, 7.2$ Hz, 1H, 8-H_a), 2.69 (dd, $J = 12.8, 4.4$ Hz, 1H, 2-H_a), 2.55 (dd, $J = 12.8, 9.9$ Hz, 1H, 2-H_b), 2.40 (dd, $J = 16.2, 6.1$ Hz, 1H, 8-H_b), 2.23 (ddq, $J = 9.3, 5.0, 6.7$ Hz, 1H, 6-H), 1.72 (d, $J = 1.2$ Hz, 3H, 14-Me), 1.62 (d, $J = 1.2$ Hz, 3H, 4-Me), 0.59 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H, 6-Me) ppm; ¹³C-NMR (125 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.00 ppm): δ 207.5 (s, C-9), 171.1 (s, C-1), 143.4 (s, C-20), 142.2 (s, C-16), 142.0 (s, C-14), 139.6 (s, C-18), 137.0 (s, C-4), 134.7 (d, C-12), 130.7 (d, C-5), 127.1 (d, C-13), 125.8 (d, C-11), 124.7 (d, C-21), 120.4 (d, C-17), 118.3 (d, C-19), 89.3 (d, C-10), 75.7 (d, C-3), 72.4 (d, C-7), 65.0 (t, 20-CH₂OH), 56.8 (q, 10-OMe), 46.7 (t, C-15), 45.6 (t, C-8), 44.3 (t, C-2), 38.1 (d, C-6), 16.8 (q, 14-Me), 14.9 (q, 6-Me), 12.3 (q, 4-Me) ppm; UPLC-MS [MeOH] t_R = 1.94 min; HRMS [ESI] m/z für C₂₆H₃₅NO₆Na [M+Na]⁺: ber. 480.2362, gef. 480.2369; MSMS {480.2 [M+Na]⁺}: 448.2 [M-MeOH+Na]⁺, 438.2 [M-H₂C=C=O{McLafferty}+Na]⁺, 420.2 [M-H₂C=C=O{McLafferty}-H₂O+Na]⁺, 354.2 [M-C₇H₁₀O₂{2 * McLafferty}+Na]⁺, 322.2 [M-C₇H₁₀O₂{2 * McLafferty}-MeOH+Na]⁺, 312.2 [M-C₇H₁₀O₂{2 * McLafferty}-H₂C=C=O +Na]⁺, 280.1 [M-C₇H₁₀O₂{2 * McLafferty}-MeOH-H₂C=C=O +Na]⁺.

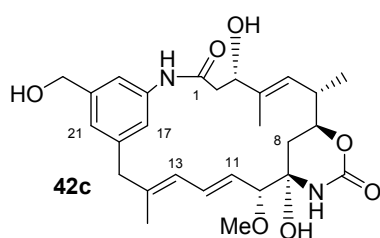
20-(*O*-Carbamoyl-oxymethyl)proansamitocin **42b**:



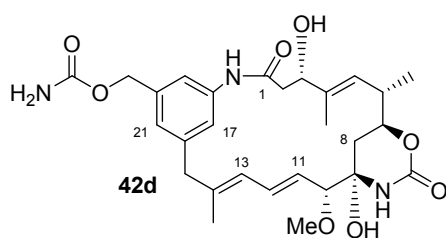
¹H-NMR (500 MHz, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 7.34 (dd, $J = 1.8, 1.8$ Hz, 1H, 17-H), 7.19 (dd, $J = 1.8, 1.8$ Hz, 1H, 19-H), 6.97 (dd, $J = 1.8, 1.8$ Hz, 1H, 21-H), 6.83 (ddd, $J = 15.2, 11.1, 0.8$ Hz, 1H, 12-H), 6.08 (dq, $J = 11.1, 1.1$ Hz, 1H, 13-H), 5.37 (dd, $J = 15.2, 8.6$ Hz, 1H, 11-H), 5.28 (ddq, $J = 9.4, 1.1, 1.4$ Hz, 1H, 5-H), 5.01 (s, 2H, 20-CH₂O-R), 4.50 (dd, $J = 8.6, 0.8$ Hz, 1H, 10-H), 4.34 (ddd, $J = 9.8, 4.4, 1.1$ Hz, 1H, 3-H), 4.04 (ddd, $J = 6.8, 6.4, 4.9$ Hz, 1H, 7-H), 3.40 (d, $J = 13.7$ Hz, 1H, 15-H_a), 3.33 (s, 3H, 10-OMe), 3.24 (d, $J = 13.7$ Hz, 1H, 15-H_b), 2.87 (dd, $J = 16.2, 6.8$ Hz, 1H, 8-H_a), 2.69 (dd, $J = 12.9, 4.4$ Hz, 1H, 2-H_a), 2.55 (dd, $J = 12.9, 9.8$ Hz, 1H, 2-H_b), 2.40 (dd, $J = 16.2, 6.4$ Hz, 1H, 8-H_b), 2.24 (ddq, $J = 9.4, 4.9, 6.7$ Hz, 1H, 6-H), 1.72 (d, $J = 1.1$ Hz, 3H, 14-Me), 1.62 (d, $J = 1.4$ Hz, 3H,

4-Me), 0.60 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H, 6-Me) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, Methanol- d_4 , Methanol- $\text{d}_4 = 49.00$ ppm): δ 207.6 (s, C-9), 171.1 (s, C-1), 159.7 (s, 20- $\text{CH}_2\text{OCONH}_2$), 142.2 (s, C-16), 142.0 (s, C-14), 139.7 (s, C-18), 138.9 (s, C-20), 137.1 (s, C-4), 134.6 (d, C-12), 130.6 (d, C-5), 127.2 (d, C-13), 125.8 (d, C-11), 125.3 (d, C-21), 120.9 (d, C-17), 118.9 (d, C-19), 89.3 (d, C-10), 75.7 (d, C-3), 72.4 (d, C-7), 67.0 (t, 20- $\text{CH}_2\text{O-R}$), 56.8 (q, 10-OMe), 46.6 (t, C-15), 45.5 (t, C-8), 44.3 (t, C-2), 38.2 (d, C-6), 16.8 (q, 14-Me), 15.0 (q, 6-Me), 12.4 (q, 4-Me) ppm; **UPLC-MS** [MeOH] $t_R = 1.95$ min; **HRMS** [ESI] m/z für $\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_7\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: ber. 523.2420, gef. 523.2412.

7-*O*-Carbamoyl-20-hydroxymethylproansamitocin **42c**:



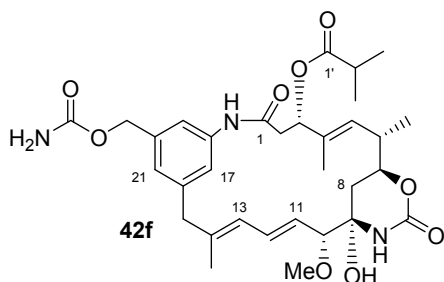
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, Methanol- d_4 , $\text{CHD}_2\text{OD} = 3.31$ ppm): δ 7.95 (s, 1H, 17-H), 6.93 (s, 1H, 21-H), 6.86 (s, 1H, 19-H), 6.64 (dd, $J = 15.1, 10.7$ Hz, 1H, 12-H), 6.11 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H, 13-H), 5.57 (dd, $J = 15.1, 9.2$ Hz, 1H, 11-H), 5.46 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, 5-H), 4.55 (s, 2H, 20- CH_2OH), 4.33-4.27 (m, 1H, 7-H), 4.24-4.20 (m, 1H, 3-H), 3.57 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H, 10-H), 3.45 (d, $J = 13.8$ Hz, 1H, 15- H_a), 3.34 (s, 3H, 10-OMe), 3.20 (d, $J = 13.8$ Hz, 1H, 15- H_b), 2.84 (dd, $J = 15.6, 3.0$ Hz, 1H, 2- H_a), 2.73 (dd, $J = 15.6, 7.0$ Hz, 1H, 2- H_b), 2.68-2.62 (m, 1H, 6-H), 1.97 (d, $J = 14.3$ Hz, 1H, 8- H_a), 1.68 (s, 3H, 14-Me), 1.66 (s, 3H, 4-Me), 1.43 (dd, $J = 14.3, 12.4$ Hz, 1H, 8- H_b), 1.14 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, 6-Me) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, Methanol- d_4 , Methanol- $\text{d}_4 = 49.00$ ppm): δ 171.4 (s, C-1), n.b. (s, 7-OCONH), 143.0 (s, C-20), 142.0 (s, C-16), 140.9 (s, C-14), 140.3 (s, C-18), 138.8 (s, C-4), 134.6 (d, C-12), 127.6 (d, C-13), 126.4 (d, C-11), 125.3 (d, C-5), 123.9 (d, C-21), 119.0 (d, C-17), 116.2 (d, C-19), 89.0 (d, C-10), 82.2 (s, C-9), 79.3 (d, C-7), 73.0 (d, C-3), 64.6 (t, 20- CH_2OH), 56.2 (q, 10-OMe), 46.6 (t, C-15), 41.2 (t, C-2), 38.2 (d, C-6), 35.9 (t, C-8), 18.0 (q, 6-Me), 16.6 (q, 14-Me), 16.4 (q, 4-Me) ppm; **UPLC-MS** [MeOH] $t_R = 2.05$ min; **HRMS** [ESI] m/z für $\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_7\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: ber. 523.2420, gef. 523.2418.

7-*O*-Carbamoyl-20-(*O*-carbamoyl-oxymethyl)proansamitocin **42d**:

¹H-NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 8.01 (s, 1H, 17-H), 6.94 (s, 1H, 19-H), 6.85 (s, 1H, 21-H), 6.64 (dd, *J* = 15.2, 10.8 Hz, 1H, 12-H), 6.11 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H, 13-H), 5.57 (dd, *J* = 15.2, 9.3 Hz, 1H, 11-H), 5.46 (ddq, *J* = 9.3, 1.6, 1.5 Hz, 1H, 5-H), 5.00 (s, 2H, 20-CH₂O-R), 4.30 (ddd, *J* = 11.8, 9.8, 1.5 Hz, 1H, 7-H), 4.23-4.19 (m, 1H, 3-H), 3.57 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, 10-H), 3.45 (d, *J* = 13.7 Hz, 1H, 15-H_a), 3.34 (s, 3H, 10-OMe), 3.21 (d, *J* = 13.7 Hz, 1H, 15-H_b), 2.84 (dd, *J* = 15.4, 2.8 Hz, 1H, 2-H_a), 2.73 (dd, *J* = 15.4, 6.8 Hz, 1H, 2-H_b), 2.65 (ddq, *J* = 9.8, 9.3, 6.7 Hz, 1H, 6-H), 1.97 (dd, *J* = 1.5, 14.1 Hz, 1H, 8-H_a), 1.68 (s, 3H, 14-Me), 1.66 (s, 3H, 4-Me), 1.43 (dd, *J* = 14.1, 11.8 Hz, 1H, 8-H_b), 1.14 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, 6-Me) ppm; **¹³C-NMR** (125 MHz, Methanol-*d*₄, Methanol-*d*₄ = 49.00 ppm): δ 171.6 (s, C-1), 159.7 (s, 20-CH₂OCONH₂), 156.0 (s, 7-OCONH), 142.5 (s, C-16), 140.7 (s, C-14), 140.3 (s, C-18), 139.0 (s, C-4), 138.8 (s, C-20), 135.0 (d, C-12), 128.0 (d, C-13), 126.8 (d, C-11), 125.6 (d, C-5), 124.9 (d, C-21), 119.9 (d, C-17), 117.2 (d, C-19), 89.2 (d, C-10), 82.4 (s, C-9), 79.7 (d, C-7), 73.2 (d, C-3), 67.0 (t, 20-CH₂O-R), 56.4 (q, 10-OMe), 46.6 (t, C-15), 41.0 (t, C-2), 38.4 (d, C-6), 36.2 (t, C-8), 18.0 (q, 6-Me), 16.8 (q, 14-Me), 15.1 (q, 4-Me) ppm; **UPLC-MS** [MeOH] *t*_R = 2.12 min; **HRMS** [ESI] *m/z* für C₂₈H₃₇N₃O₈Na [M+Na]⁺: ber. 566.2478, gef. 566.2480; **MSMS** {544 [M+H]⁺}: 482.3 [M-CO₂-H₂O+H]⁺, 450.3 [M-CO₂-H₂O-MeOH+H]⁺, 389.2 [M-CO₂-H₂O-MeOH-HOC(O)NH₂+H]⁺, 371.2 [M-CO₂-2H₂O-MeOH-HOC(O)NH₂+H]⁺.

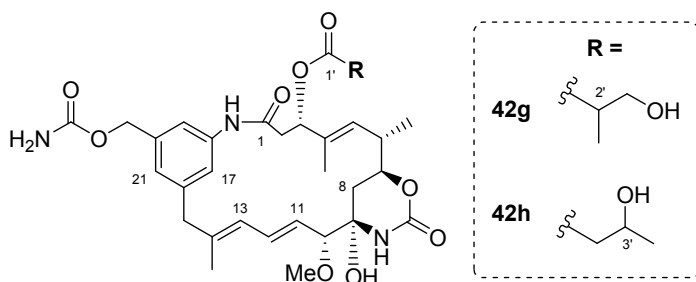
3-*O*-Isobutyryl-7-*O*-carbamoyl-20-hydroxymethylproansamitocin **42e**:

UPLC-MS [MeOH] *t*_R = 2.31 min; **HRMS** [ESI] *m/z* für C₃₁H₄₂N₂O₈Na [M+Na]⁺: ber. 593.2839, gef. 593.2842; **MSMS** {593.30 [M+Na]⁺}: 505.25 [M-HOC(O)CH(CH₃)₂+Na]⁺.

3-*O*-Isobutyryl-7-*O*-carbamoyl-20-(*O*-carbamoyl-oxymethyl)proansamitocin **42f**:

¹H-NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 8.05 (s, 1H, 17-H), 6.95 (s, 1H, 19-H), 6.82 (s, 1H, 21-H), 6.68 (dd, *J* = 15.1, 10.9 Hz, 1H, 12-H), 6.10 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H, 13-H), 5.59 (dd, *J* = 15.1, 9.0 Hz, 1H, 11-H), 5.33-5.30 (m, 1H, 3-H), 5.28 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, 5-H), 5.00 (s, 2H, 20-CH₂O-R), 4.30-4.25 (m, 1H, 7-H), 3.59 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, 10-H), 3.44 (d, *J* = 14.9 Hz, 1H, 15-H_a), 3.35 (s, 3H, 10-OMe), 3.27 (d, *J* = 14.9 Hz, 1H, 15-H_b), 2.89 (dd, *J* = 14.2, 2.9 Hz, 1H, 2-H_a), 2.71 (dd, *J* = 14.2, 8.5 Hz, 1H, 2-H_b), 2.71-2.60 (m, 1H, 6-H), 2.61 (qq, *J* = 6.9, 6.8 Hz, 1H, 2'-H), 1.99 (dd, *J* = 14.2, 2.0 Hz, 1H, 8-H_a), 1.73 (s, 3H, 14-Me), 1.71 (s, 3H, 4-Me), 1.48 (dd, *J* = 14.2, 12.2 Hz, 1H, 8-H_b), 1.17 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, 2'-Me_a), 1.16 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, 2'-Me_b), 1.09 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, 6-Me) ppm; **¹³C-NMR** (125 MHz, Methanol-*d*₄, Methanol-*d*₄ = 49.00 ppm): δ 177.6 (s, C-1'), 169.5 (s, C-1), 159.7 (s, 20-CH₂CONH₂), 155.8 (s, 7-OC(=O)NH), 142.5 (s, C-16), 140.2 (s, C-18), 140.1 (s, C-14), 138.9 (s, C-20), 136.1 (s, C-4), 134.6 (d, C-12), 128.7 (d, C-13), 126.9 (d, C-11), 126.3 (d, C-5), 124.9 (d, C-21), 120.1 (d, C-17), 117.2 (d, C-19), 88.8 (d, C-10), 82.4 (s, C-9), 79.3 (d, C-7), 74.4 (d, C-3), 67.0 (t, 20-CH₂O-R), 56.5 (q, 10-OMe), 46.1 (t, C-15), 40.5 (t, C-2), 38.7 (d, C-6), 36.1 (t, C-8), 35.2 (d, C-2'), 19.42 (q, 2'-Me_a), 19.38 (q, 2'-Me_b), 18.1 (q, 6-Me), 17.1 (q, 14-Me), 16.0 (q, 4-Me) ppm; **UPLC-MS** [MeOH] *t*_R = 2.32 min; **HRMS** [ESI] *m/z* für C₃₂H₄₃N₃O₉Na [M+Na]⁺: ber. 636.2897, gef. 636.2891; **MSMS** {636.3 [M+Na]⁺}: 548.2 [M-HOC(O)CH(CH₃)₂+Na]⁺.

Gemisch **42g/h** (**42g**:**42h** = 3:2):



Grundstruktur **42g/h** (gemeinsame Daten):

¹H-NMR (500 MHz, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 8.04 (s, 1H, 17-H), 6.95 (s, 1H, 19-H), 6.82 (s, 1H, 21-H), 6.68 (dd, *J* = 15.2, 11.1 Hz, 1H, 12-H), 6.12-6.05 (m, 1H, 13-H), 6.62-5.54 (m, 1H, 11-H), 5.40-5.36 (m, 1H, 3-H), 5.35-5.29 (m, 1H, 5-H), 5.00 (s, 2H, BnH), 4.31-4.25 (m, 1H, 7-H), 3.59 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, 10-H), 3.45-3.42 (m, 1H, 15-H_a), 3.35 (s, 3H, 10-OMe), 3.29-3.26 (m, 1H, 15-H_b), 2.93-2.87 (m, 1H, 2-H_a), 2.77-2.68 (m, 1H, 2-H_b), 2.68-2.62 (m, 1H, 6-H), 2.00-1.94 (m, 1H, 8-H_a), 1.74 (s, 3H, 14-Me), 1.72 (s, 3H, 4-Me), 1.50-1.44 (m, 1H, 8-H_b), 1.10 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, 6-Me) ppm; **¹³C-NMR** (125 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.00 ppm): δ 169.3 (s, C-1), 159.4 (s, 20-CH₂CONH₂), n.b. (s, 7-OCNH), 142.1 (s, C-16), n.b. (s, C-18), 140.0 (s, C-14), 138.7 (s, C-20), 135.0 (s, C-4), 134.2 (d, C-12), 128.3 (d, C-13), 126.6 (d, C-11), 125.9 (d, C-5), 124.6 (d, C-21), 119.7 (d, C-17), 116.8 (d, C-19), 88.5 (d, C-10), 82.1 (s, C-9), 79.1 (d, C-7), 74.2 (d, C-3), 66.6 (t, 20-CH₂CONH₂), 56.2 (q, 10-OMe), 46.0 (t, C-15), 39.8 (t, C-2), 38.4 (d, C-6), 35.9 (t, C-8), 18.0 (q, 6-Me), 17.0 (q, 14-Me), 15.6 (q, 4-Me) ppm; **UPLC-MS** [MeOH] *t_R* = 2.18 min; **HRMS** [ESI] *m/z* für C₃₂H₄₄N₃O₁₀ [M+H]⁺: ber. 630.3027, gef. 630.3035; **MSMS** {652.32 [M+Na]⁺}: 548.27 [M-HOC(O)C₃H₆OH+Na]⁺.

3-*O*-(2-Hydroxymethylpropionyl)-7-*O*-carbamoyl-20-(*O*-carbamoyl-oxymethyl)proansamitocin **42g** (Daten der Esterseitenkette):

¹H-NMR (500 MHz, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 3.75-3.70 (m, 1H, 2'-CH_aH_bOH), 3.65-3.58 (m, 1H, 2'-CH_aH_bOH), 2.74-2.66 (m, 1H, 2'-H), 1.15 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, 2'-Me); **¹³C-NMR** (125 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.00 ppm): δ 175.4 (s, C-1'), 64.9 (t, 2'-CH₂OH), 43.8 (d, C-2'), 18.4 (q, 2'-Me).

3-*O*-(3-Hydroxybutyryl)-7-*O*-carbamoyl-20-(*O*-carbamoyl-oxymethyl)proansamitocin **42h** (Daten der Esterseitenkette):

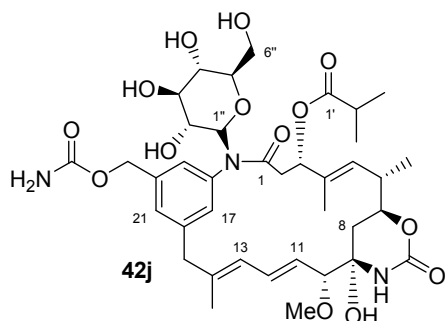
¹H-NMR (500 MHz, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 4.19 (ddq, *J* = 9.3, 6.3, 6.0 Hz, 1H, 3'-H), 2.51 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H, 2'-H_a), 2.51 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, 2'-H_b), 1.23 (d, *J* = 6.0 Hz, 3'-Me); **¹³C-NMR** (125 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.00 ppm): δ 176.1 (s, C-1'), 65.2 (d, C-3'), 44.6 (t, C-2'), 23.3 (q, 3'-Me).

3-*O*-Hydroxyvaleroyl*-7-*O*-carbamoyl-20-(*O*-carbamoyl-oxymethyl)proansamitocin **42i**:

UPLC-MS [MeOH] t_R = 2.23 min; **HRMS** [ESI] m/z für $C_{33}H_{46}N_3O_{10}$ $[M+H]^+$: ber. 644.3183, gef. 644.3181; **MSMS** $\{666.3 [M+Na]^+\}$: 548.3 $[M-HOC(O)C_4H_8OH+Na]^+$.

* = *oder entsprechendes Konstitutionsisomer*.

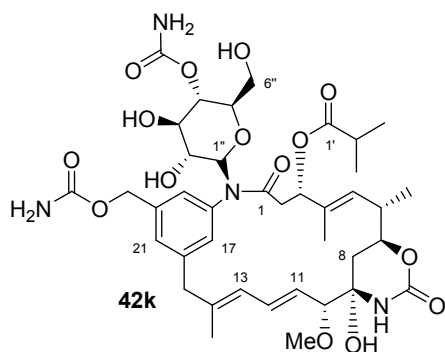
N-(β -D-Glukopyranosyl)-3-*O*-isobutyryl-7-*O*-carbamoyl-20-(*O*-carbamoyl-oxymethyl)proansamitocin **42j**:



1H -NMR (500 MHz, Methanol- d_4 , CHD_2OD = 3.31 ppm): δ 7.48 (dd, J = 1.8, 1.8 Hz, 1H, 19-H), 7.37 (dd, J = 1.8, 1.8 Hz, 1H, 21-H), 7.33 (dd, J = 1.8, 1.8 Hz, 1H, 17-H), 6.56 (dd, J = 15.4, 11.0 Hz, 1H, 12-H), 6.14 (d, J = 11.0 Hz, 1H, 13-H), 5.64 (d, J = 9.3 Hz, 1H, 1''-H), 5.45 (dd, J = 15.4, 8.8 Hz, 1H, 11-H), 5.29 (dd, J = 6.9, 6.9 Hz, 1H, 3-H), 5.18 (dq, J = 10.0, 1.1 Hz, 1H, 5-H), 5.11 (s, 1H, 20- CH_aH_bO -R), 5.10 (s, 1H, 20- CH_aH_bO -R), 4.00 (ddd, J = 12.0, 10.0, 2.1 Hz, 1H, 7-H), 3.86 (dd, J = 12.1, 2.3 Hz, 1H, 6''-H_a), 3.68 (dd, J = 12.1, 5.7 Hz, 1H, 6''-H_b), 3.56 (d, J = 8.8 Hz, 1H, 10-H), 3.51 (d, J = 13.0 Hz, 1H, 15-H_a), 3.40 (dd, J = 9.2, 9.1 Hz, 1H, 3''-H), 3.40-3.32 (m, 1H, 5''-H), 3.35 (s, 3H, 10-OMe), 3.32-3.28 (m, 1H, 15-H_b), 3.07 (dd, J = 9.4, 9.2 Hz, 1H, 4''-H), 2.72 (dd, J = 9.3, 9.1 Hz, 1H, 2''-H), 2.63 (qq, J = 7.0, 6.9 Hz, 1H, 2'-H), 2.48 (ddq, J = 10.0, 10.0, 6.4 Hz, 1H, 6-H), 2.41 (d, J = 6.9 Hz, 2H, 2-H_a & 2-H_b), 1.80 (s, 3H, 14-Me), 1.53 (dd, J = 14.0, 2.1 Hz, 1H, 8-H_a), 1.35 (dd, J = 14.0, 12.0 Hz, 1H, 8-H_b), 1.19 (d, J = 7.0 Hz, 3H, 2'-Me_a), 1.18 (d, J = 6.9 Hz, 3H, 2'-Me_b), 1.17 (d, J = 1.1 Hz, 3H, 4-Me), 1.07 (d, J = 6.4 Hz, 3H, 6-Me) ppm; **^{13}C -NMR** (125 MHz, Methanol- d_4 , Methanol- d_4 = 49.00 ppm): δ 177.7 (s, C-1'), 172.8 (s, C-1), 159.5 (s, 20- CH_2CONH_2), n.b. (s, 7-OCONH), 142.8 (s, C-16), 141.8 (s, C-14), 139.8 (s, C-20), 139.2 (s, C-18), 137.1 (s, C-4), 134.0 (d, C-12), 131.6 (d, C-17), 129.5 (d, C-21), 129.3 (d, C-5), 128.4 (d, C-19), 128.2 (d, C-11), 125.0 (d, C-13), 89.7 (d, C-10), 83.5 (d, C-1''), 81.8 (s, C-9), 78.2 (d, C-7), 79.4 (d, C-5''), 79.4 (d, C-3''), 74.1 (d, C-3), 71.1 (d, C-4''), 70.8 (d, C-2''), 66.4 (t, 20- CH_2O -R), 62.8 (t, C-6''), 56.8 (q, 10-OMe), 46.9 (t, C-15), 39.5 (s, C-2), 38.0 (d, C-6), 36.3 (t, C-8), 34.8 (d, C-2'), 19.4 (q, 2'-Me_a), 19.4 (q, 2'-Me_b), 17.1 (q, 6-Me), 15.5 (q, 14-Me), 14.5 (q, 4-Me) ppm; **UPLC-MS** [MeOH] t_R = 1.95 min; **HRMS** [ESI] m/z für $C_{38}H_{53}N_3O_{14}Na$

[M+Na]⁺: ber. 798.3425 gef. 798.3455; **MSMS** {798.4 [M+Na]⁺: 710.3 [M-HOC(O)CH(CH₃)₂+Na]⁺, 666.3 [M-HOC(O)CH(CH₃)₂-CO₂+Na]⁺, 548.3 [M-HOC(O)CH(CH₃)₂-C₆H₁₀O₅+Na]⁺, 504.3 [M-HOC(O)CH(CH₃)₂-C₆H₁₀O₅-CO₂+Na]⁺.

N-(β-D-4-*O*-Carbamoyl-glukopyranosyl)-3-*O*-isobutyryl-7-*O*-carbamoyl-20-(*O*-carbamoyloxymethyl)proansamitocin **42k**:

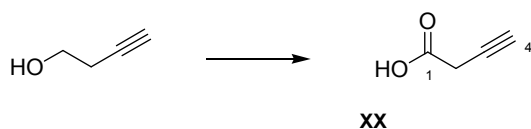


¹H-NMR (500 MHz, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 7.50 (dd, *J* = 1.7, 1.7 Hz, 1H, 19-H), 7.38 (dd, *J* = 1.7, 1.7 Hz, 1H, 21-H), 7.33 (dd, *J* = 1.7, 1.7 Hz, 1H, 17-H), 6.56 (dd, *J* = 15.4, 11.0 Hz, 1H, 12-H), 6.14 (dq, *J* = 11.0, 0.9 Hz, 1H, 13-H), 5.66 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H, 1"-H), 5.46 (dd, *J* = 15.4, 8.8 Hz, 1H, 11-H), 5.32 (dd, *J* = 10.5, 3.5 Hz, 1H, 3-H), 5.19 (dq, *J* = 9.8, 1.1 Hz, 1H, 5-H), 5.15 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H, 20-CH_aH_bO-R), 5.09 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H, 20-CH_aH_bO-R), 4.30 (dd, *J* = 9.9, 9.4 Hz, 1H, 4"-H), 4.00 (ddd, *J* = 12.2, 10.0, 2.1 Hz, 1H, 7-H), 3.67 (dd, *J* = 12.6, 2.2 Hz, 1H, 6"-H_a), 3.59 (dd, *J* = 12.6, 6.1 Hz, 1H, 6"-H_b), 3.57 (dd, *J* = 9.4, 9.2 Hz, 1H, 3"-H), 3.56 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, 10-H), 3.51 (ddd, *J* = 9.9, 6.1, 2.2 Hz, 1H, 5"-H), 3.51 (d, *J* = 12.7 Hz, 1H, 15-H_a), 3.35 (s, 3H, 10-OMe), 3.33-3.28 (m, 1H, 15-H_b), 2.78 (dd, *J* = 9.4, 9.2 Hz, 1H, 2"-H), 2.62 (qq, *J* = 7.0, 7.0 Hz, 1H, 2'-H), 2.48 (ddq, *J* = 10.0, 9.8, 6.4 Hz, 1H, 6-H), 2.45 (dd, *J* = 14.7, 10.5 Hz, 1H, 2-H_a), 2.41 (dd, *J* = 14.7, 3.5 Hz, 1H, 2-H_b), 1.80 (s, 3H, 14-Me), 1.53 (dd, *J* = 13.9, 2.1 Hz, 1H, 8-H_a), 1.35 (dd, *J* = 13.9, 12.2 Hz, 1H, 8-H_b), 1.19 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, 2'-Me_a), 1.18 (d, *J* = 1.1 Hz, 3H, 4-Me), 1.18 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, 2'-Me_b), 1.08 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, 6-Me) ppm; **¹³C-NMR** (125 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.00 ppm): δ 177.8 (s, C-1'), 172.9 (s, C-1), 159.6 (s, 20-CH₂CONH₂), 159.3 (s, 4"-OCONH₂), 155.8 (s, 7-OCONH), 143.2 (s, C-16), 141.7 (s, C-14), 139.9 (s, C-20), 139.2 (s, C-18), 137.2 (s, C-4), 134.4 (d, C-12), 131.9 (d, C-17), 129.9 (d, C-21), 129.6 (d, C-5), 128.6 (d, C-19), 128.6 (d, C-11), 125.4 (d, C-13), 89.7 (d, C-10), 83.6 (d, C-1"), 82.0 (s, C-9), 78.5 (d, C-7), 78.4 (d, C-5"), 77.1 (d, C-3"), 74.5 (d, C-3), 72.7 (d, C-4"), 71.3 (d, C-2"), 66.6 (t, 20-CH₂O-R), 62.7 (t, C-6"), 57.0 (q, 10-OMe), 47.3 (t, C-15), 39.5 (t, C-2), 38.3 (d, C-6), 36.8 (t, C-8), 35.3 (d, C-2'), 19.6 (q, 2'-Me_a), 19.5 (q, 2'-Me_b), 17.1 (q, 6-Me), 16.4 (q,

14-Me), 14.6 (q, 4-Me) ppm; **UPLC-MS** [MeOH] t_R = 1.96 min; **HRMS** [ESI] m/z für $C_{39}H_{54}N_4O_{15}Na$ $[M+Na]^+$: ber. 841.3483, gef. 841.3477; **MSMS** {841.4 $[M+Na]^+$ }: 753.3 $[M-HOC(O)CH(CH_3)_2+Na]^+$, 709.3 $[M-HOC(O)CH(CH_3)_2-CO_2+Na]^+$, 692.3 $[M-HOC(O)CH(CH_3)_2-HOC(O)NH_2+Na]^+$, 548.3 $[M-HOC(O)CH(CH_3)_2-C_7H_{11}NO_6+Na]^+$.

6.6 Synthese der Verbindungen aus Kapitel 4.1.3

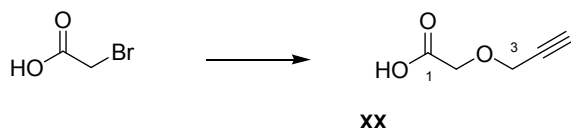
3-Butinsäure (43a)¹⁰²



Homopropargylalkohol (2 g, 28.6 mmol, 1 Äq.) wurde in literaturbekannter Weise zu Carbonsäure **43a** (1.42 g, 16.9 mmol, 59 %) oxidiert, welche nach Umkristallisation (Aufnehmen in wenig CH₂Cl₂, gefolgt von Fällen mit 5-10 Vol. Pentan, sowie abschließender Lagerung bei -20 °C; Kristalle wachsen in Lösung und gelbe Verunreinigungen scheiden sich an der Kolbenwand an) als blass-gelbliche Plättchen erhalten wurde. *Die analytischen Daten stimmen mit den berichteten Angaben überein.*¹⁵⁹

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 3.38 (d, *J* = 2.7 Hz, 2H, 2-H), 2.24 (t, *J* = 2.7 Hz, 1H, 4-H) ppm.

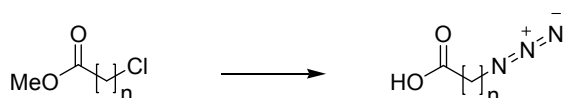
2-(2-Propinyloxy)essigsäure (46)¹⁰³



Bromessigsäure (6.95 g, 50 mmol, 1.0 Äq.) wurde in literaturbekannter Weise zu Carbonsäure **46** (2.12 g, 18.6 mmol, 37 %) umgesetzt, welche als bräunlicher Feststoff erhalten wurde. *Die analytischen Daten stimmen mit den berichteten Angaben überein.*

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 7.52 (bs, 1H, COOH), 4.33 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H, 3-H), 4.27 (s, 2H, 2-H), 2.51 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H, 5-H) ppm; **Smp.:** 38-40 °C.

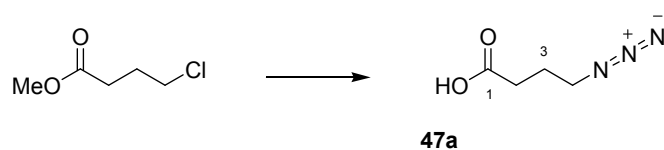
Allgemeine Vorschrift zur Synthese der Azidocarbonsäuren 47a/b



¹⁵⁹ P. Wipf, P. D. G. Coish, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 5053-5061.

Chlorcarbonsäuremethylester (1.0 Äq.) wird in DMF gelöst, mit Natriumazid (1.2 Äq.) sowie einer Spatelspitze Natriumiodid (kat.) versetzt und 24 Stunden bei 60 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wird mit Wasser verdünnt, dreimal mit CH₂Cl₂ extrahiert und *in vacuo* eingengt. Der Rückstand wird in Natronlauge [1 M] (1.25 Äq.) aufgenommen und bis zum vollständigen Umsatz (Kontrolle per Dünnschichtchromatographie, EE) bei Raumtemperatur gerührt. Die wässrige Phase wird mit CH₂Cl₂ gewaschen und mit Salzsäure [6 M] angesäuert. Nach dreimaliger Extraktion mit Ethylacetat werden die vereinigten organischen Phasen getrocknet [MgSO₄] und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt.

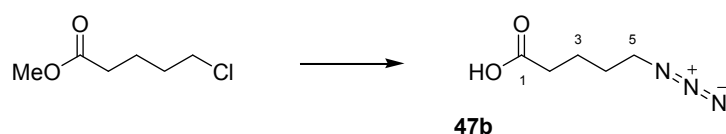
4-Azido-n-buttersäure (**47a**):



4-Chlorbuttersäuremethylester (4.37 g, 32 mmol, 1.0 Äq.) wurde entsprechend der allgemeinen Verfahrensweise zu Carbonsäure **47a** (2.61 g, 20.2 mmol, 63 %) umgesetzt, welche nach Entfernung verunreinigenden Dimethylformamids (70 °C, Hochvakuum) als gelbliches Öl erhalten wurde. *Die analytischen Daten stimmen mit den berichteten Angaben überein.*¹⁶⁰

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 10.71 (bs, 1H, COOH), 3.38 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, 4-H), 2.48 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, 2-H), 1.92 (tt, *J* = 7.2, 6.7 Hz, 2H, 3-H) ppm.

5-Azido-n-valeriansäure (**47b**):



5-Chlorvaleriansäuremethylester (15.1 g, 100 mmol, 1.0 Äq.) wurde entsprechend der allgemeinen Verfahrensweise zu Carbonsäure **47b** (8.27 g, 57.8 mmol, 58 %) umgesetzt, welche nach Entfernung verunreinigenden Dimethylformamids (70 °C, Hochvakuum) als farbloses Öl erhalten wurde. *Die analytischen Daten stimmen mit den berichteten Angaben überein.*¹⁶¹

¹⁶⁰ B. Carboni, M. Vaultier, R. Carrié, *Tetrahedron* **1987**, 43, 1799-1810.

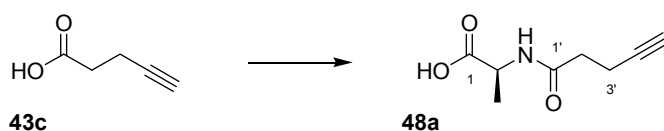
¹⁶¹ K. S. Orwig, T. A. Dix, *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 7007-7009.

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 10.38 (bs, 1H, COOH), 3.31 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, 5-H), 2.40 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, 2-H), 1.83-1.55 (m, 4H, 3-H & 4-H) ppm.

Synthese der *N*-Acyl-L-alanin-Derivate 48a/b

Nach literaturbekanntem Verfahren¹⁶ wurde 4-Pentinsäure (**43c**) (392 mg, 4 mmol, 1.0 Äq.) unter Argonatmosphäre in 5 mL CH₂Cl₂ gelöst mit EDC*HCl (1.15 g, 6 mmol, 1.5 Äq.) versetzt und nach Zugabe von *N*-Hydroxysuccinimid für vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt (Kontrolle per Dünnschichtchromatographie, EE). Die Lösung wurde mit Ethylacetat verdünnt, zweimal mit Natriumphosphatpufferlösung [pH = 6, 50 mM], sowie NaCl-Lösung gewaschen, getrocknet und *in vacuo* bis zur Trockene eingeeengt. Das erhaltene *O*-(Pent-4-ynoyl)-*N*-hydroxysuccinimid wurde in 18 mL DME:H₂O = 1:1 aufgenommen und direkt eingesetzt. L-Alanin-Derivat (*vide infra*; 2 mmol, 1.0 Äq.) wurde in 5-10 mL DME:H₂O = 1:1 aufgenommen und unter Argonatmosphäre mit Triethylamin (555 µL, 4 mmol, 2.0 Äq.), sowie 9 mL der *O*-(Pent-4-ynoyl)-*N*-hydroxysuccinimid-Lösung (2 mmol, 1.0 Äq.) versetzt und 4.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Einengung des Lösungsmittels *in vacuo* wurde der wässrige Rückstand mit verdünnter Salzsäure [1 M] auf pH = 3-4 eingestellt und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit NaCl-Lösung gewaschen, getrocknet [MgSO₄], *in vacuo* eingeeengt und einer säulenchromatographischen Reinigung (PE:EE = 5:3, + 2 % AcOH) unterzogen.

N-(Pent-4-ynoyl)-L-alanin (**48a**):

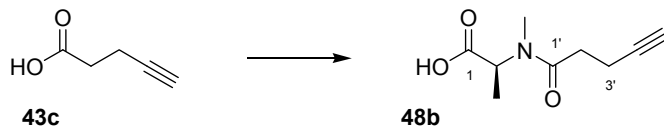


L-Alanin (178 mg, 2 mmol, 1 Äq.) wurde in beschriebener Weise (*vide supra*) zu Carbonsäure **48a** (329 mg, 1.95 mmol, 97 %) umgesetzt, welche als farbloses Öl erhalten wurde.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 8.63 (bs, 1H, COOH), 6.35 (bs, 1H, NH), 4.62 (pseudo quint, *J* = 7.2 Hz, 1H, 2-H), 2.58-2.51 (m, 2H, 3'-H), 2.50-2.45 (m, 2H, 2'-H), 2.02 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H, 5'-H), 1.48 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H, 2-Me) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 176.6 (s, C-1), 171.6 (s, C-1'), 82.6 (s, C-4'), 69.8 (d, C-5'),

48.4 (d, C-2), 35.2 (t, C-2'), 18.2 (q, 2-Me), 14.9 (t, C-3') ppm; **HRMS** [ESI] m/z für $C_8H_{10}NO_3$ $[M-H]^-$ ber. 168.0661, gef. 168.0667.

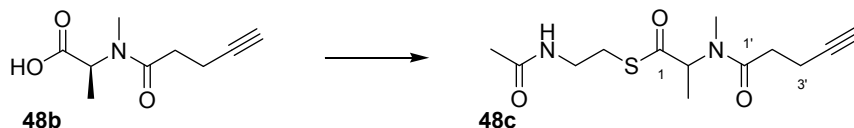
N-Methyl-*N*-(pent-4-yn-1-yl)-L-alanin (**48b**):



N-Methyl-L-alanin (206 mg, 2 mmol, 1 Äq.) wurde in beschriebener Weise (*vide supra*) zu Carbonsäure **48b** (303 mg, 1.65 mmol, 83 %) umgesetzt, welche als wachsartiger, farbloser Feststoff erhalten wurde.

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$, $CHCl_3 = 7.26$ ppm): δ 8.98 (bs, 1H, COOH), 5.18 (q, $J = 7.4$ Hz, 1H, 2-H), 2.98 (s, 3H, *N*-Me), 2.65-2.60 (m, 2H, 2'-H), 2.59-2.51 (m, 2H, 3'-H), 1.97 (t, $J = 2.6$ Hz, 1H, 5'-H), 1.43 (d, $J = 7.5$ Hz, 3H, 2-Me) ppm; **^{13}C -NMR** (100 MHz, $CDCl_3$, $CDCl_3 = 77.16$ ppm): δ 176.4 (s, C-1), 172.2 (s, C-1'), 83.3 (s, C-4'), 68.9 (d, C-5'), 52.7 (d, C-2), 32.8 (t, C-2'), 31.9 (q, *N*-Me), 14.4 (q, 2-Me), 14.4 (t, C-3') ppm; **HRMS** [ESI] m/z für $C_9H_{12}NO_3$ $[M-H]^-$ ber. 182.0817, gef. 182.0824; **Smp.:** 20-25 °C.

S*-[*N*-Methyl-*N*-(pent-4-yn-1-yl)-(D/L)-alanoyl]-*N*-acetylcysteamin **48c*

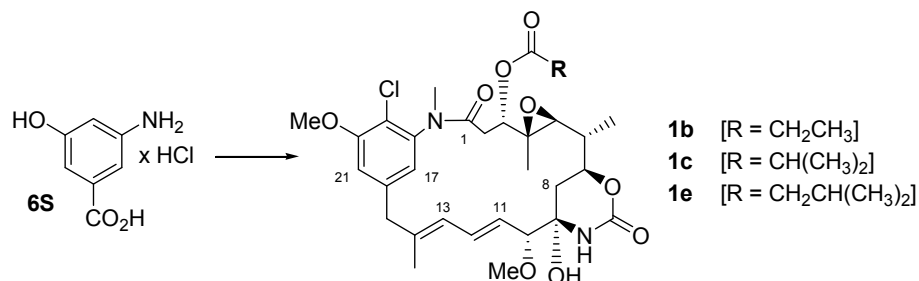


Carbonsäure **48b** (175 mg, 0.95 mmol, 1 Äq.) wurde entsprechend der unter Abschnitt 6.9 beschriebenen, allgemeinen Verfahrensweise zur Synthese von *N*-Acetylcysteamine-basierten Thioestern zu Verbindung **48c** (168 mg, 0.59 mmol, 62 %) umgesetzt, welche nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EE = 1:10) als farbloses Öl erhalten wurde.

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$, $CHCl_3 = 7.26$ ppm): δ 5.91 (bs, 1H, NH), 5.18 (q, $J = 7.2$ Hz, 1H, 2-H), 3.52-3.30 (m, 2H, NCH_2), 3.06-2.99 (m, 2H, CH_2S), 2.97 (s, 3H, *N*-Me), 2.68-2.61 (m, 2H, 2'-H), 2.60-2.54 (m, 2H, 3'-H), 1.97 (t, $J = 2.6$ Hz, 1H, 5'-H), 1.96 (s, 3H, NAc), 1.40 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H, 2-Me); **^{13}C -NMR** (100 MHz, $CDCl_3$, $CDCl_3 = 77.16$ ppm): δ 199.9 (s, C-1), 172.1 (s, C-1'), 170.4 (s, $NCOCH_3$), 83.4 (s, C-4'), 68.9 (d, C-5'), 54.7 (d, C-2), 39.9 (t, $NHCH_2$), 32.8 (t, C-2'), 31.9 (q, *N*-Me), 28.6 (t, CH_2S), 23.4 (q, $NCOCH_3$), 19.2 (q, 2-Me), 14.4 (t, C-3') ppm; **HRMS** [ESI] m/z für $C_{13}H_{20}N_2O_3SNa$ $[M+Na]^+$ ber. 307.1092, gef. 307.1096.

6.7 Mutasyntesen aus Kapitel 4.1.3

Allgemeine Hinweise zu Optimierungsstudien



Die Fermentation von *A. pretiosum* HGF073 erfolgte analog der unter 6.2 und 6.5 beschriebenen Verfahrensweisen, wobei der K-Medium-Zusatz (3 % {w/v} L-Valin-Lösung; Endkonzentration 3 g/L) gegebenenfalls durch andere Zusätze ersetzt wurde. Bevorzugt wurden Kulturen mit einem Endvolumen von 45 mL betrachtet. Die Zugabe von AHBA*HCl **6S**, gelöst in Wasser (1 mL pro Kultur), erfolgte nach 3 Tagen der Vorkultivierung in einer Portion (0.42 mmol/L Kulturvolumen). Nach 2 weiteren Tagen wurden Proben des Fermentationsüberstands (vgl. 6.2) nach Bestimmung des Restkulturvolumens einer analytischen *reversed phase*-HPLC-UV-Quantifizierung unterzogen, wobei AP-3 **1c** als Quantifizierungsstandard (vgl. Anhang 7.1), und massenspektrometrisch charakterisierte Proben von AP-2 **1c** und AP-4 **1e** als Retentionszeitstandards eingesetzt wurden (*vide infra*).³⁶ Bevorzugt wurde Säule C18-A (siehe 6.1) und Elutionsprogramm A (siehe 6.2; AP-2 **1b** t_R = 12.7 min, AP-3 **1c** t_R = 13.8 min, AP-4 **1e** t_R = 15.1 min) verwendet.

Ansamitocin P-2 **1b**:

UPLC-MS [MeCN] t_R = 2.01 min; **UPLC-MS** [MeOH] t_R = 2.32 min; **HRMS** [ESI] m/z für C₃₁H₄₂ClN₂O₉ [M+H]⁺: ber. 621.2579, gef. 621.2574; **MSMS** {621.3 [M+H]⁺}: 547.2 [M-HOC(O)CH₂Me+H]⁺.

Ansamitocin P-3 **1c**:

UPLC-MS [MeCN] t_R = 2.10 min; **UPLC-MS** [MeOH] t_R = 2.41 min; **HRMS** [ESI] m/z für C₃₂H₄₄ClN₂O₉ [M+H]⁺: ber. 635.2735, gef. 635.2734; **MSMS** {635.3 [M+H]⁺}: 547.2 [M-HOC(O)CH(Me)₂+H]⁺.

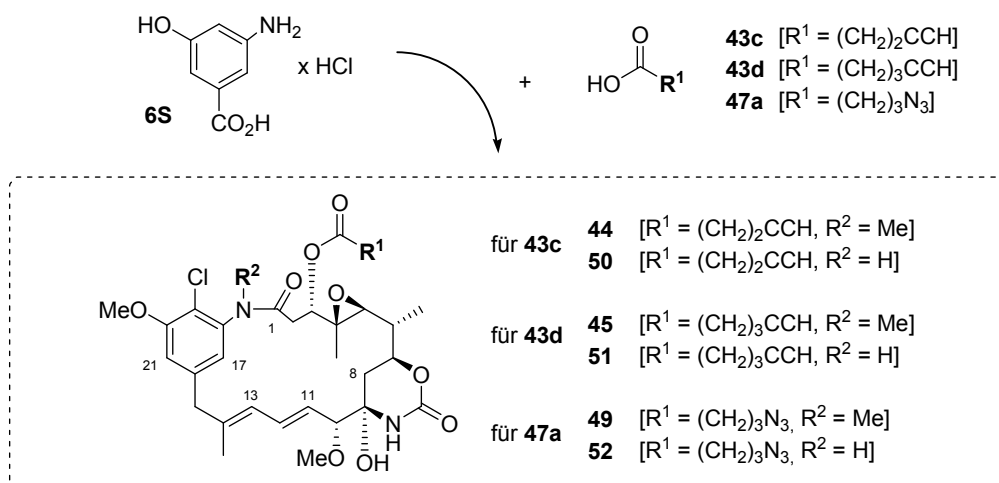
Ansamitocin P-4 **1e**:

UPLC-MS [MeCN] $t_R = 2.21$ min; **UPLC-MS** [MeOH] $t_R = 2.51$ min; **HRMS** [ESI] m/z für $C_{33}H_{46}ClN_2O_9$ $[M+H]^+$: ber. 649.2892, gef. 649.2898; **MSMS** {649.3 $[M+H]^+$ }: 547.2 $[M-HOC(O)CH_2CH(Me)_2+H]^+$.

Allgemeine Hinweise zu Carbonsäuresupplementierungsstudien

Die Fermentation von *A. pretiosum* HGF073 und anschließende extraktive Aufarbeitung der Kulturen erfolgte analog der unter 6.2 und 6.5 beschriebenen Verfahrensweisen, wobei der K-Medium-Zusatz bevorzugt durch 3 mL Aminosäurelösung (1.5 % {w/v} L-Valin, 4.5 % {w/v} L-Threonin; Endkonzentration 1 g/L bzw. 3 g/L) und 1.5 mL Kokosnusswasser (Endkonzentration 3.3 % {v/v}) für die bevorzugte Kulturgröße von 45 mL Endvolumen ersetzt wurde. Kokosnusswasser wurde aus jungen Kokosnüssen (z.B. Fachhandel für asiatische Lebensmittel) entnommen und nach Sterilfiltration bei -80 °C gelagert. Mutasynthone (1.25 mmol/L Kulturvolumen) und Carbonsäuren (vorzugsweise 12.5 mmol/L) wurden in DMSO:Wasser (vorzugsweise 1:1) gelöst, bevorzugt mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung [1 M] neutralisiert (Volumen der Mutasynthon-Lösung weniger als 10 % {v/v} des Kulturvolumens) und steril filtriert. Die Zugabe zu den Hauptkulturen erfolgte nach 2 Tagen der Vorinkubation mittels des unter 6.5 beschriebenen Spritzenpumpensystems über 3 Tage, wobei bevorzugt 75 % der Vorläuferlösung innerhalb der ersten 42 Stunden hinzuge tropft wurden. Nach 7-10 Tagen Gesamtfermentationsdauer wurden die Fermentationsüberstände der Kulturen massenspektrometrisch durch UPLC-ESI-MS und analytische *reversed phase*-HPLC untersucht, wobei eine Quantifizierung für Derivate mit identischem Chromophor mittels der für AP-3 **1c** ermittelten Kalibrierwerte erfolgte (siehe Hinweise zu Optimierungsstudien).

3-*O*-Acyl-maytansinol-Derivate **44**, **45**, **49**, **50-52**



Die mutasynthetische Darstellung der 3-*O*-Acyl-maytansinol-Derivate erfolgte unter Supplementierung von AHBA*HCl **6S** und der jeweiligen Carbonsäure zu Kulturen von *A. pretiosum* HGF073 entsprechend des allgemeinen Protokolls für Carbonsäuresupplementierungsstudien. Die extraktive Aufarbeitung erfolgte jeweils aus den vereinigten Kulturbrühen verschiedener Fermentationsläufe (für Carbonsäure **43c**: 735 mL; **43d**: 1.215 L; **47a**: 1.05 L) unterschiedlicher Produktivität mit teilweise variierenden Parametern (zugefütterte Carbonsäuremenge, Additive, Kulturgröße). Die jeweiligen Rohextrakte wurden der tabellarisch aufgeführten Reinigung unterzogen, die massenspektrometrisch verfolgt wurde (*vide infra*).

Tabelle: Chromatographische Reinigung der Ansamitocin-Derivate **44**, **45**, **49**, **50-52**.

PROBE	SYSTEM (KAP. 6.1)	ELUTIONSBEDINGUNGEN	FRAKTIONEN
Säure 43c : Rohextrakt	SiO ₂	EE	F-1 (R _f (EE) 0.5-0.2)
F-1	C18-P _[A]	H ₂ O:MeOH [A:B], Flussrate = 5 mL/min Gradient (t [min]/B [%]): (0/20) (5/20) (52/60) (100/100)	F-2 (t _R = 73.0-76.0 min) F-3 (t _R = 77.5-80.5 min)
F-2	C18-SP	H ₂ O:MeCN [A:B], Flussrate = 2.5 mL/min Gradient (t [min]/B [%]): (0/5) (5/5) (40/60) (55/100)	50 (t _R = 30.5 min)
F-3 (3 Portionen)	CN-SP	H ₂ O:MeCN [A:B], Flussrate = 2.5 mL/min Gradient (t [min]/B [%]): (0/5) (5/5) (45/30) (75/45)	44 (t _R = 69.5 min)

Säure 43d : Rohextrakt	SiO ₂	EE	F-1 (R _f (EE) 0.5-0.2)
F-1	C18-P _[B]	H ₂ O[+ 0.1% FA]:MeOH[+ 0.1% FA] [A:B], Flussrate = 15 mL/min Gradient (t [min]/B [%]): (0/20) (5/20) (55/70) (99/85)	F-2 (t _R = 70.0-72.0 min)
F-2 (5 Portionen)	CN-SP	H ₂ O:MeCN [A:B], Flussrate = 2.5 mL/min Gradient (t [min]/B [%]): (0/5) (5/5) (105/45)	45 (t _R = 85.0 min)
Säure 47a : Rohextrakt	SiO ₂	EE	F-1 (R _f (EE) 0.5-0.2)
F-1	C18-P _[B]	H ₂ O[+ 0.1% FA]:MeOH[+ 0.1% FA] [A:B], Flussrate = 15 mL/min Gradient (t [min]/B [%]): (0/20) (5/20) (55/70) (89/85)	49 (t _R = 74.0 min)

Die tabellarisch aufgeführten Derivate konnten als farblose Feststoffe erhalten werden. Die Derivate **51** und **52** konnten in Fermentationsüberständen massenspektrometrisch detektiert werden (*vide infra*). Die angegebenen Fermentationsausbeuten beziehen sich auf die eingesetzten Kulturbrühemischungen verschiedener Optimierungsstudien, während im Diskussions- und Beschreibungskapitel die über Kalibrierung geschätzten Produkttiter (s. Anhang 7.1) unter den bevorzugten Standardkonditionen angegeben sind. Bevorzugt wurde Säule C18-A (siehe 6.1) und Elutionsprogramm A (siehe 6.2; **44**: t_R = 13.4 min, **45**: t_R = 13.9 min, **49**: t_R = 14.3 min) verwendet. Für Fermentationen unter Supplementierung von 5-Hexinsäure (**43d**) kam alternativ Säule CN-A (siehe 6.1) und Elutionsprogramm B (siehe 6.2; AP-3 **1c**: t_R = 12.5 min; **45**: t_R = 13.3 min) zur Anwendung.

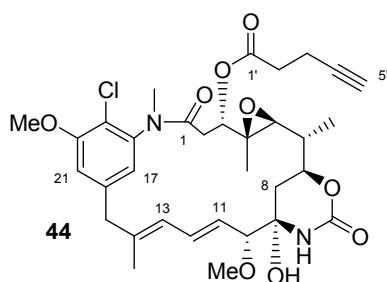
Tabelle: Erhaltene Ansamitocin-Derivate **44**, **45**, **49**, **50-52**.

DERIVAT	ISOLIERT	AUSBEUTE (MISCHANSÄTZE)
44	9.2 mg (14.3 µmol)	12.5 mg/L
50	2.6 mg (4.1 µmol)	3.4 mg/L
45	28.0 mg (42.5 µmol)	23.0 mg/L
51	HRMS	-
49	19.5 mg (28.8 µmol)	18.9 mg/L
52	HRMS	-

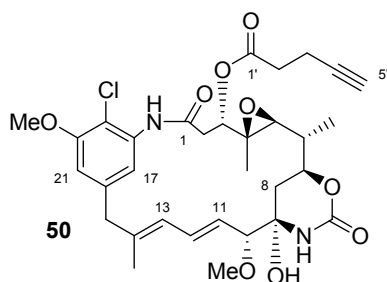
Die Kalibrierung ist als verlässlich anzusehen: Aus den vereinigten Kulturbrühen unter Supplementierung von 5-Hexinsäure (**43d**) mit einer geschätzten Ausbeute von 30.7 mg des

Derivats **45** (250 mL mit 24.6 mg/L und 850 mL mit 28.9 mg/L; Voluminaangaben vor Extraktion, Integrale kalibriert über AP-3 **1c**-Standard), konnten 28.0 mg von Verbindung **45** isoliert werden. Aus den vereinigten Kulturbrühen unter Supplementierung von 4-Azido-buttersäure (**47a**) mit einer geschätzten Ausbeute von 16.6 mg des Derivats **49** (1030 mL mit 16.1 mg/L; Hinweise *vide supra*) gelang die Isolierung von 19.5 mg der Verbindung **49**. Dies entspricht einer Abweichung von ± 10 -15 %.

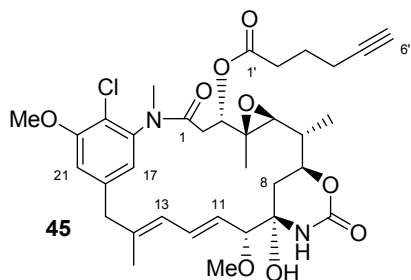
3-*O*-(Pent-4-yn-1-yl)maytansinol **44**:



¹H-NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 7.15 (d, J = 2.0 Hz, 1H, 21-H), 6.91 (d, J = 2.0 Hz, 1H, 17-H), 6.63 (dd, J = 15.4, 11.3 Hz, 1H, 12-H), 6.27 (d, J = 11.3 Hz, 1H, 13-H), 5.61 (dd, J = 15.4, 8.8 Hz, 1H, 11-H), 4.78 (dd, J = 11.9, 2.9 Hz, 1H, 3-H), 4.19 (ddd, J = 9.1, 8.5, 7.1 Hz, 1H, 7-H), 3.98 (s, 3H, 20-OMe), 3.59 (d, J = 8.8 Hz, 1H, 10-H), 3.57 (d, J = 12.5 Hz, 1H, 15-H_a), 3.37 (s, 3H, 10-OMe), 3.34 (d, J = 12.5 Hz, 1H, 15-H_b), 3.16 (s, 3H, *N*-Me), 2.87-2.70 (m, 2H, 2'-H), 2.75 (d, J = 9.6 Hz, 1H, 5-H), 2.63-2.45 (m, 2H, 3'-H), 2.58 (dd, J = 14.0, 11.9 Hz, 1H, 2-H_a), 2.37 (t, J = 2.7 Hz, 1H, 5'-H), 2.14 (dd, J = 14.0, 2.9 Hz, 1H, 2-H_b), 1.73 (s, 3H, 14-Me), 1.58-1.49 (m, 2H, 8-H), 1.57-1.50 (m, 1H, 6-H), 1.22 (d, J = 6.5 Hz, 3H, 6-Me), 0.88 (s, 3H, 4-Me) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, Methanol-*d*₄, Methanol-*d*₄ = 49.00 ppm): δ 172.1 (s, C-1'), 171.3 (s, C-1), 157.5 (s, C-20), 155.3 (s, 7-CONH), 143.1 (s, C-18), 142.7 (s, C-16), 141.3 (s, C-14), 133.8 (d, C-12), 130.0 (d, C-11), 125.8 (d, C-13), 123.2 (d, C-17), 119.8 (s, C-19), 115.0 (d, C-21), 89.7 (d, C-10), 83.6 (s, C-4'), 81.9 (s, C-9), 78.4 (d, C-3), 75.9 (d, C-7), 70.5 (d, C-5'), 67.9 (d, C-5), 61.8 (s, C-4), 57.2 (q, 20-OMe), 57.0 (q, 10-OMe), 47.6 (t, C-15), 39.2 (d, C-6), 37.5 (t, C-8), 36.3 (q, *N*-Me), 34.4 (t, C-2'), 33.8 (t, C-2), 15.8 (q, 14-Me), 14.7 (t, C-3'), 14.7 (q, 6-Me), 12.4 (q, 4-Me) ppm; **UPLC-MS** [MeOH] t_R = 2.37 min, [MeOH] t_R = 2.04 min; **HRMS** [ESI] m/z für C₃₃H₄₂ClN₂O₉ [M+H]⁺: ber. 645.2579, gef. 645.2581.

N-Demethyl-3-*O*-(pent-4-yn-1-yl)maytansinol **50**:

¹H-NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 7.06 (bs, 1H, 21-H), 6.94 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, 17-H), 6.68 (dd, *J* = 15.5, 11.1 Hz, 1H, 12-H), 6.26 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H, 13-H), 5.63 (dd, *J* = 15.5, 8.8 Hz, 1H, 11-H), 4.84 (dd, *J* = 11.2, 2.7 Hz, 1H, 3-H), 4.25-4.19 (m, 1H, 7-H), 3.96 (s, 3H, 20-OMe), 3.62 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, 10-H), 3.57 (d, *J* = 13.3 Hz, 1H, 15-H_a), 3.37 (s, 3H, 10-OMe), 3.34 (d, *J* = 13.3 Hz, 1H, 15-H_b), 2.88-2.68 (m, 2H, 2'-H), 2.80 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H, 5-H), 2.80-2.73 (m, 1H, 2-H_a), 2.60-2.45 (m, 2H, 3'-H), 2.34 (t, *J* = 2.7 Hz, 1H, 5'-H), 2.24-2.11 (m, 1H, 2-H_b), 1.74 (s, 3H, 14-Me), 1.66-1.55 (m, 2H, 8-H), 1.63-1.55 (m, 1H, 6-H), 1.24 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, 6-Me), 1.03 (bs, 3H, 4-Me) ppm; **¹³C-NMR** (125 MHz, Methanol-*d*₄, Methanol-*d*₄ = 49.00 ppm): δ 172.9 (s, C-1'), 172.2 (s, C-1), 157.2 (s, C-20), 155.3 (s, 7-CONH), 141.7 (s, C-16), 140.8 (s, C-14), 137.5 (s, C-18), 133.6 (d, C-12), 130.3 (d, C-11), 126.6 (d, C-13), 122.7 (d, C-17), 119.3 (s, C-19), 114.1 (d, C-21), 89.5 (d, C-10), 83.3 (s, C-4'), 81.9 (s, C-9), 78.2 (d, C-3), 76.0 (d, C-7), 70.7 (d, C-5'), 67.8 (d, C-5), 62.0 (s, C-4), 57.0 (q, 10-OMe), 57.0 (q, 20-OMe), 47.6 (t, C-15), 39.2 (d, C-6), 37.4 (t, C-8), 34.4 (t, C-2'), 33.2 (t, C-2), 16.0 (q, 14-Me), 14.8 (q, 6-Me), 14.7 (s, C-4'), 12.8 (q, 4-Me) ppm; **UPLC-MS** [MeCN] *t*_R = 1.89 min; **HRMS** [ESI] *m/z* für C₃₂H₄₀ClN₂O₉ [M+H]⁺: ber. 631.2422, gef. 631.2424; **MSMS** {631.21 [M+H]⁺: 533.21 [M-HOC(O)(CH₂)₂C≡CH+H]⁺.

3-*O*-(Hex-5-yn-1-yl)maytansinol **45**:

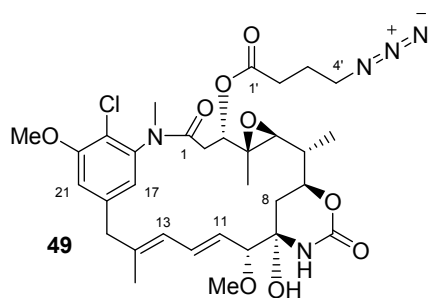
¹H-NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 7.15 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, 21-H), 6.96 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, 17-H), 6.63 (dd, *J* = 15.4, 11.0 Hz, 1H, 12-H), 6.32 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H, 13-H), 5.62 (dd, *J* = 15.4, 9.0 Hz, 1H, 11-H), 4.8 (dd, *J* = 12.0, 2.7 Hz, 1H, 3-H), 4.19

(ddd, $J = 11.0, 10.9, 3.0$ Hz, 1H, 7-H), 3.98 (s, 3H, 20-OMe), 3.58 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, 10-H), 3.56 (d, $J = 13.0$ Hz, 1H, 15-H_a), 3.37 (s, 3H, 10-OMe), 3.32 (d, $J = 13.0$ Hz, 1H, 15-H_b), 3.16 (s, 3H, *N*-Me), 2.76 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H, 5-H), 2.69 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, 2'-H), 2.59 (dd, $J = 13.9, 12.0$ Hz, 1H, 2-H_a), 2.39 (t, $J = 2.7$ Hz, 1H, 6'-H), 2.37-2.21 (m, 2H, 4'-H), 2.14 (dd, $J = 13.9, 2.7$ Hz, 1H, 2-H_b), 1.91-1.83 (m, 2H, 3'-H), 1.73 (s, 3H, 14-Me), 1.61-1.48 (m, 1H, 6-H), 1.58 (dd, $J = 13.8, 3.0$ Hz, 1H, 8-H_a), 1.52 (dd, $J = 13.8, 11.0$ Hz, 1H, 8-H_b), 1.23 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, 6-Me), 0.88 (s, 3H, 4-Me) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, Methanol-*d*₄, Methanol-*d*₄ = 49.00 ppm): δ 173.4 (s, C-1'), 171.4 (s, C-1), 157.5 (s, C-20), 155.3 (s, 7-CONH), 143.1 (s, C-18), 142.7 (s, C-16), 141.1 (s, C-14), 133.8 (d, C-12), 130.0 (d, C-11), 126.0 (d, C-13), 123.3 (d, C-17), 119.8 (s, C-19), 114.9 (d, C-21), 89.7 (d, C-10), 84.7 (s, C-5'), 81.9 (s, C-9), 78.1 (d, C-3), 75.9 (d, C-7), 70.9 (d, C-6'), 67.9 (d, C-5), 61.8 (s, C-4), 57.2 (q, 20-OMe), 57.0 (q, 10-OMe), 47.5 (t, C-15), 39.2 (d, C-6), 37.5 (t, C-8), 36.2 (q, *N*-Me), 33.8 (t, C-2), 33.8 (t, C-2'), 24.9 (t, C-3'), 18.4 (t, C-4'), 15.8 (q, 14-Me), 14.7 (q, 6-Me), 12.4 (q, 4-Me) ppm; **UPLC-MS** [MeOH] $t_R = 2.42$ min, [MeCN] $t_R = 2.10$ min; **HRMS** [ESI] m/z für C₃₄H₄₃ClN₂O₉Na [M+Na]⁺: ber. 681.2555, gef. 681.2563; **MSMS** {659.28 [M+H]⁺: 547.22 [M-HOC(O)(CH₂)₃C≡CH+H]⁺.

N-Demethyl-3-*O*-(hex-5-in-oyl)maytansinol **51**:

UPLC-MS [MeCN] $t_R = 1.92$ min; **HRMS** [ESI] m/z für C₃₃H₄₂ClN₂O₉ [M+H]⁺: ber. 645.2579, gef. 645.2580; **MSMS** {645.25 [M+H]⁺: 533.20 [M-HOC(O)(CH₂)₃C≡CH+H]⁺.

3-*O*-(4-Azidobutyryl)maytansinol **49**:



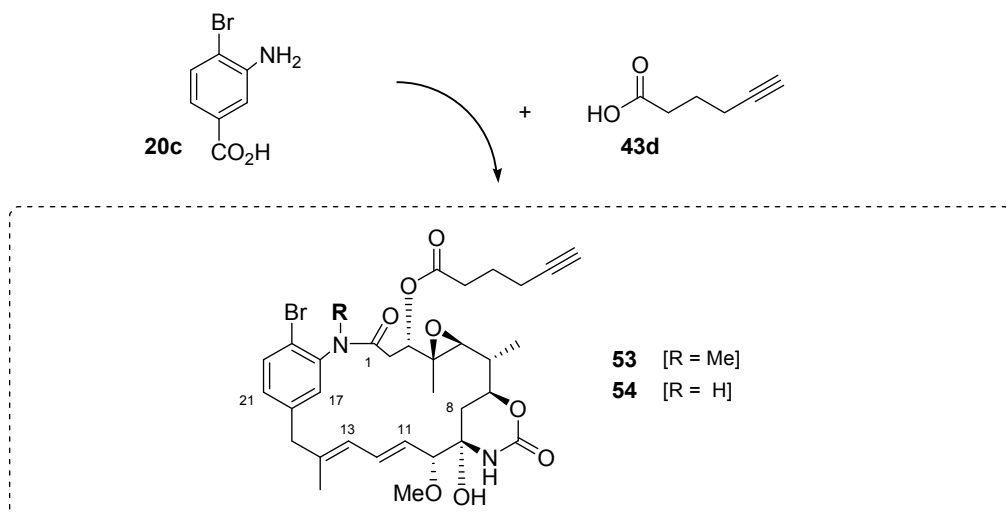
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, Methanol-*d*₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 7.15 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, 21-H), 6.91 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, 17-H), 6.63 (dd, $J = 15.3, 11.1$ Hz, 1H, 12-H), 6.29 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H, 13-H), 5.60 (dd, $J = 15.3, 8.7$ Hz, 1H, 11-H), 4.79 (dd, $J = 11.9, 2.8$ Hz, 1H, 3-H), 4.19 (ddd, $J = 10.6, 10.6, 3.8$ Hz, 1H, 7-H), 3.98 (s, 3H, 20-OMe), 3.59 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, 10-H), 3.57 (d, $J = 12.7$ Hz, 1H, 15-H_a), 3.48-3.38 (m, 2H, 4'-H), 3.37 (s, 3H, 10-OMe), 3.32 (d, $J = 12.7$ Hz, 1H, 15-H_b), 3.16 (s, 3H, *N*-Me), 2.75 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H, 5-H), 2.72-2.55 (m, 2H, 2'-H), 2.59 (dd, $J = 13.9, 11.9$ Hz, 1H, 2-H_a), 2.14 (dd, $J = 13.9, 2.8$ Hz, 1H, 2-H_b), 1.97-1.90

(m, 2H, 3'-H), 1.73 (s, 3H, 14-Me), 1.59-1.49 (m, 1H, 6-H), 1.57 (dd, $J = 13.6, 3.8$ Hz, 1H, 8-H_a), 1.52 (dd, $J = 13.6, 10.6$ Hz, 1H, 8-H_b), 1.22 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, 6-Me), 0.88 (s, 3H, 4-Me) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.00 ppm): δ 173.1 (s, C-1'), 171.4 (s, C-1), 157.5 (s, C-20), 155.3 (s, 7-OCONH), 143.0 (s, C-18), 142.7 (s, C-16), 141.1 (s, C-14), 133.8 (d, C-12), 129.9 (d, C-11), 126.0 (d, C-13), 123.1 (d, C-17), 119.8 (s, C-19), 115.0 (d, C-21), 89.6 (d, C-10), 81.9 (s, C-9), 78.2 (d, C-3), 75.9 (d, C-7), 67.9 (d, C-5), 61.8 (s, C-4), 57.2 (q, 20-OMe), 57.0 (q, 10-OMe), 51.7 (t, C-4'), 47.6 (t, C-15), 39.2 (d, C-6), 37.5 (t, C-8), 36.2 (q, *N*-Me), 33.8 (t, C-2), 32.1 (t, C-2'), 25.3 (t, C-3'), 15.8 (q, 14-Me), 14.7 (q, 6-Me), 12.4 (q, 4-Me) ppm; **UPLC-MS** [MeCN] $t_R = 2.17$ min; **HRMS** [ESI] m/z für C₃₂H₄₃ClN₅O₉ [M+H]⁺: ber. 676.2749, gef. 676.2758; **MSMS** {676.26 [M+H]⁺}: 547.22 [M-HOC(O)(CH₂)₃N₃+H]⁺.

N-Demethyl-3-*O*-(4-azidobutyryl)maytansinol **52**:

UPLC-MS [MeCN] $t_R = 1.94$ min; **HRMS** [ESI] m/z für C₃₁H₄₀ClN₅O₉ [M+Na]⁺: ber. 684.2412, gef. 684.2421.

3-*O*-(Hex-5-in-oyl)-19-brom-20-demethoxymaytansinol-Derivate **53**, **54**



Die mutasynthetische Darstellung der Derivate **53** und **54** erfolgte unter Supplementierung von 3-Amino-4-brombenzoesäure (**20c**)³⁶ und 5-Hexinsäure (**43d**) zu Kulturen von *A. pretiosum* HGF073 entsprechend des allgemeinen Protokolls für Carbonsäure-supplementierungsstudien, gefolgt von extraktiver Aufarbeitung. In der Summe wurden

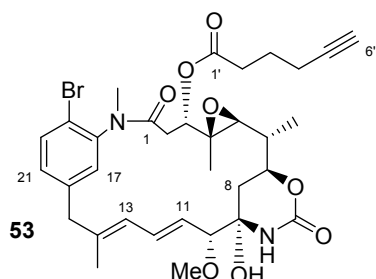
1.35 mmol (293 mg) des Mutasyntons **20c** und 13.5 mmol (1.5 g) der Carbonsäure **43d** zu insgesamt 720 mL Fermentationsansätzen supplementiert (1.88 bzw. 18.8 mmol/L). Die vereinigten Rohextrakte wurden der tabellarisch aufgeführten chromatographischen Reinigung unterzogen (*vide infra*), die massenspektrometrisch verfolgt wurde.

Tabelle: Chromatographische Reinigung der Ansamitocin-Derivate **53** und **54**.

PROBE	SYSTEM (KAP. 6.1)	ELUTIONSBEDINGUNGEN	FRAKTIONEN
Rohextrakt	SiO ₂	PE:EE 4:1 → EE	F-1 (R _f (EE) 0.5-0.2)
F-1	C18-P _[A]	H ₂ O:MeOH [A:B], Flussrate = 5 mL/min Gradient (t [min]/B [%]): (0/20) (5/20) (60/60) (120/100)	F-2 (t _R = 99.0-102.0 min) F-3 (t _R = 105.0-109.0 min)
F-2	CN-SP	H ₂ O:MeCN [A:B], Flussrate = 2.5 mL/min Gradient (t [min]/B [%]): (0/5) (5/5) (45/30) (85/45)	54 (t _R = 68.0 min)
F-3	CN-SP	H ₂ O:MeCN [A:B], Flussrate = 2.5 mL/min Gradient (t [min]/B [%]): (0/5) (5/5) (45/30) (85/45)	53 (t _R = 72.0 min)

Die Derivate **53** (1.2 mg, 1.8 µmol, 0.13 %, 1.7 mg/L) und **54** (0.2 mg, 0.3 µmol, 0.02 %, 0.3 mg/L) konnten als farblose Feststoffe isoliert werden.

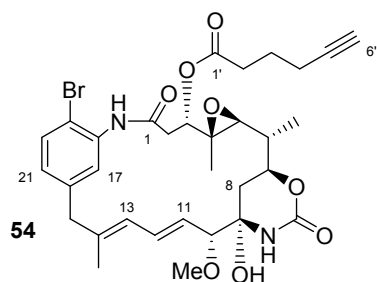
3-*O*-(Hex-5-in-oyl)-19-brom-20-demethoxymaytansinol **53**:



¹H-NMR (500 MHz, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 7.72 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, 20-H), 7.37 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, 17-H), 7.32 (dd, *J* = 8.2, 2.1 Hz, 1H, 21-H), 6.62 (dd, *J* = 15.5, 11.0 Hz, 1H, 12-H), 6.34 (ddq, *J* = 11.0, 1.1, 1.1 Hz, 1H, 13-H), 5.62 (dd, *J* = 15.5, 8.8 Hz, 1H, 11-H), 4.80 (dd, *J* = 12.0, 3.0 Hz, 1H, 3-H), 4.19 (ddd, *J* = 10.5, 10.3, 3.8 Hz, 1H, 7-H), 3.58 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, 10-H), 3.55 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H, 15-H_a), 3.36 (s, 3H, 10-OMe), 3.31 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H, 15-H_b), 3.18 (s, 3H, *N*-Me), 2.75 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H, 5-H), 2.71 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, 2'-H), 2.53 (dd, *J* = 13.9, 12.0 Hz, 1H, 2-H_a), 2.42 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H, 6'-H), 2.38-2.22 (m, 2H, 4'-H), 2.16 (dd, *J* = 13.9, 3.0 Hz, 1H, 2-H_b), 1.92-1.84 (m, 2H, 3'-H), 1.69 (s, 3H, 14-Me), 1.58-1.50 (m, 1H, 6-H), 1.56 (dd, *J* = 13.9, 3.8 Hz, 1H, 8-H_a), 1.52 (dd, *J* = 13.9, 10.3 Hz, 1H, 8-H_b), 1.23 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, 6-Me), 0.85 (s, 3H, 4-Me) ppm; **¹³C-NMR** (125 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.00 ppm): δ 173.3 (s, C-1'), 171.3 (s, C-1), 155.3 (s,

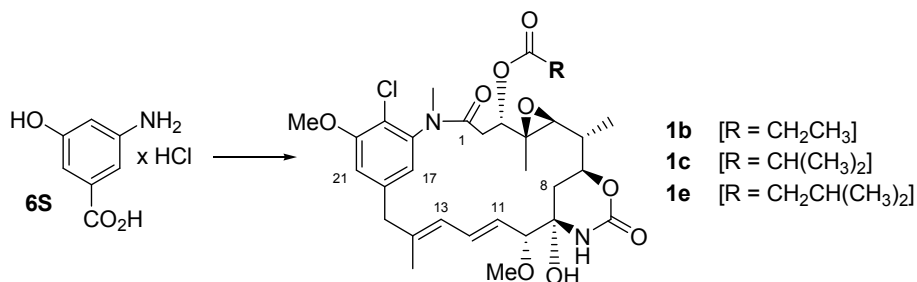
7-OCONH), 143.7 (s, C-18), 143.5 (s, C-16), 141.0 (s, C-14), 134.6 (d, C-20), 133.8 (d, C-12), 132.6 (d, C-21), 132.3 (d, C-17), 130.1 (d, C-11), 126.0 (d, C-13), 121.5 (s, C-19), 89.7 (d, C-10), 84.7 (s, C-5'), 81.9 (s, C-9), 78.0 (d, C-3), 75.9 (d, C-7), 71.0 (d, C-6'), 68.0 (d, C-5), 61.7 (s, C-4), 57.0 (q, 10-OMe), 47.0 (t, C-15), 39.1 (d, C-6), 37.5 (t, C-8), 36.4 (q, *N*-Me), 33.82 (t, C-2), 33.76 (t, C-2'), 24.9 (t, C-3'), 18.4 (t, C-4'), 15.7 (q, 14-Me), 14.7 (q, 6-Me), 12.3 (q, 4-Me) ppm; **UPLC-MS** [MeCN] t_R = 2.21 min; **HRMS** [ESI] m/z für $C_{33}H_{42}BrN_2O_8$ $[M+H]^+$: ber. 673.2125, gef. 673.2130.

N-Demethyl-19-brom-20-demethoxy-3-*O*-(hex-5-in-oyl)-maytansinol **54**:



1H -NMR (500 MHz, Methanol- d_4 , CHD_2OD = 3.31 ppm): δ 7.66 (d, J = 8.2 Hz, 1H, 20-H), 7.34 (d, J = 2.1 Hz, 1H, 17-H), 7.22 (bd, J = 8.2 Hz, 1H, 21-H), 6.66 (dd, J = 15.4, 11.1 Hz, 1H, 12-H), 6.34 (d, J = 11.1 Hz, 1H, 13-H), 5.65 (dd, J = 15.4, 8.8 Hz, 1H, 11-H), 4.84 (dd, J = 11.4, 2.8 Hz, 1H, 3-H), 4.26-4.19 (m, 1H, 7-H), 3.61 (d, J = 8.8 Hz, 1H, 10-H), 3.55 (d, J = 13.1 Hz, 1H, 15- H_a), 3.37 (s, 3H, 10-OMe), 3.31 (d, J = 13.1 Hz, 1H, 15- H_b), 2.79 (d, J = 9.8 Hz, 1H, 5-H), 2.73-2.68 (m, 2H, 2'-H), 2.67 (dd, J = 14.0, 11.4 Hz, 1H, 2- H_a), 2.35 (t, J = 2.5 Hz, 1H, 6'-H), 2.31 (dt, J = 2.5, 6.8 Hz, 2H, 4'-H), 2.22-2.12 (m, 1H, 2- H_b), 1.90-1.84 (m, 2H, 3'-H), 1.70 (s, 3H, 14-Me), 1.66-1.50 (m, 2H, 8-H), 1.62-1.54 (m, 1H, 6-H), 1.24 (d, J = 6.4 Hz, 3H, 6-Me), 0.99 (bs, 3H, 4-Me) ppm; **^{13}C -NMR** (125 MHz, Methanol- d_4 , Methanol- d_4 = 49.00 ppm): δ 173.4 (s, C-1'), 173.0 (s, C-1), 155.3 (s, 7-OCONH), 142.5 (s, C-16), 140.5 (s, C-14), 138.1 (s, C-18), 134.1 (d, C-20), 133.6 (d, C-12), 132.1 (d, C-17), 131.9 (d, C-21), 130.3 (d, C-11), 126.8 (d, C-13), 121.8 (s, C-19), 89.5 (d, C-10), 84.6 (s, C-5'), 81.9 (s, C-9), 77.8 (d, C-3), 76.0 (d, C-7), 70.8 (d, C-6'), 67.9 (d, C-5), 62.1 (s, C-4), 57.0 (q, 10-OMe), 47.0 (t, C-15), 39.3 (d, C-6), 37.5 (t, C-8), 33.8 (t, C-2'), 33.8 (t, C-2), 24.7 (t, C-3'), 18.5 (t, C-4'), 15.9 (q, 14-Me), 14.7 (q, 6-Me), 12.8 (q, 4-Me) ppm; **UPLC-MS** [MeCN] t_R = 2.01 min; **HRMS** [ESI] m/z für $C_{32}H_{40}BrN_2O_8$ $[M+H]^+$: ber. 659.1968, gef. 659.1981.

6.8 Mutasyntesen aus Kapitel 4.1.4

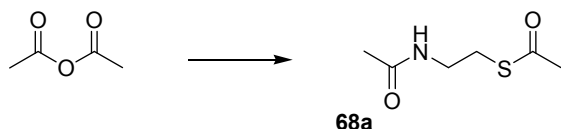


Die Vorkultivierung von *A. pretiosum* HGF073 erfolgte nach dem allgemeinen, unter 6.2 beschriebenen Fermentationsprotokoll. Die Hauptkulturen wurden in GREINER BIO-ONE CellStar 24-Well-Platten fermentiert (Vertiefung: 17 mm * ø 15 mm). Jede Vertiefung wurde mit einer sterilen Glaskugel (ø 4 mm, zuvor mit verdünnter Salzsäure gewaschen) versehen und mit 750 µL K-Medium (Grundzusammensetzung), 90 µL Additiv-Lösung und 60 µL Vorkultur befüllt. Die Platten wurden mit Parafilm versiegelt und für drei Tage bei 29 °C und 220 rpm geschüttelt. Danach wurde jeder Vertiefung 45 µL AHBA*HCl **6S**-Lösung (0.38 µmol gelöst in Wasser, 0.42 mmol/L Fermentationsansatz) hinzugefügt, die Platten erneut versiegelt und für weitere drei Tage geschüttelt. Das Restkulturvolumen (640-645 µL) wurde entnommen und zur Vorbereitung von Proben für analytische *reversed phase*-HPLC-Analyse (Säule C18-A und Elutionsprogramm D; Injektionsvolumen 80 µL; AP-2 **1b**: t_R = 5.7 min, AP-3 **1c**: t_R = 6.2 min, AP-4 **1e**: t_R = 7.0 min) verwendet (vgl. 6.2). Die Quantifizierung erfolgte analog zu den unter 6.7 beschriebenen Optimierungsstudien (s. Anhang 7.1). Stichproben wurden massenspektrometrisch überprüft, wobei die analytischen Daten mit den zuvor beschriebenen Angaben (6.7) übereinstimmen.

Zur Erstellung der Additiv-Verdünnungsreihen wurden die Substanzen zunächst in DMSO gelöst (> 50 mM) und daraufhin weiter mit Wasser verdünnt. Jede Bedingung wurde in drei parallel kultivierten Vertiefungen betrachtet.

6.9 Synthese der Verbindungen aus Kapitel 4.1.5

***S*-Acetyl-*N*-acetylcysteamin (**68a**)¹¹⁹**



N-Acetylcysteamin (358 mg, 3 mmol, 1.0 Äq.) wurde unter Argonatmosphäre in 1 mL Pyridin gelöst mit Acetanhydrid (770 mg, 7.5 mmol, 2.5 Äq.) versetzt und für 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernung des Lösungsmittels *in vacuo* wurde durch säulenchromatographische Reinigung (PE:EE = 1:2) Thioester **68a** (331 mg, 2.05 mmol, 68 %) als farbloser Feststoff erhalten. Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekannten Angaben überein.¹⁶²

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 5.82 (bs, 1H, NH), 3.44 (pseudo q, *J* = 6.1 Hz, 2H, NCH₂), 3.02 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, CH₂S), 2.36 (s, 3H, SAc), 1.97 (s, 3H, NAc) ppm; **HRMS** [ESI] *m/z* für C₆H₁₁NO₂SNa [M+Na]⁺ ber. 184.0408, gef. 184.0411; **Smp.:** 25-30 °C.

Allgemeine Vorschrift für die Synthese der Thioester **68b-i, **68l-x****

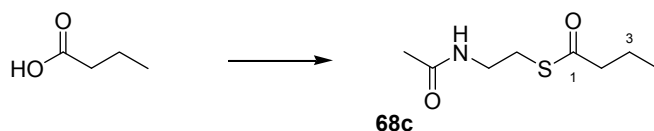
Carbonsäure (2.5 mmol, 1.0 Äq.) wird unter Argonatmosphäre in 3 ml CH₂Cl₂ gelöst mit EDC*HCl (573 mg, 3 mmol, 1.2 Äq.) und DMAP (37 mg, 0.3 mmol, 0.1 Äq.) versetzt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von *N*-Acetylcysteamin (358 mg, 3.0 mmol, 1.2 Äq.) wird die Reaktionsmischung bis zum vollständigen Umsatz (Kontrolle per Dünnschichtchromatographie) oder bis zu 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Reaktionsmischung mit 50 mL Ethylacetat verdünnt, je einmal mit Natriumphosphatpufferlösung [pH = 6, 50 mM], NaHCO₃-Lösung, sowie NaCl-Lösung gewaschen, getrocknet [MgSO₄], *in vacuo* eingeeengt und einer abschließenden säulenchromatographischen Reinigung unterzogen.

¹⁶² M. S. Lee, G. Qin, K. Nakanishi, M. G. Zagorski, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 6234-6241.

S-Propionyl-N-acetylcysteamin (68b):

Der generellen Prozedur folgend wurde Propionsäure (296 mg, 4 mmol, 1 Äq.) zu Thioester **68b** (570 mg, 3.25 mmol, 81 %) umgesetzt, welcher nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EE = 1:2) als farbloses Öl erhalten wurde. *Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekannten Angaben überein.*¹⁶³

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 6.39 (bs, 1H, NH), 3.35 (b-pseudo q, *J* = 6.3 Hz, 2H, NCH₂), 2.96 (bt, *J* = 6.2 Hz, 2H, CH₂S), 2.52 (bq, *J* = 7.5 Hz, 2H, 2-H), 1.90 (s, 3H, NAc), 1.11 (bt, *J* = 7.5 Hz, 3H, 3-H) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 200.6 (s, C-1), 170.5 (s, NCOCH₃), 39.6 (t, NHCH₂), 37.4 (t, C-2), 28.3 (t, CH₂S), 23.1 (q, NCOCH₃), 9.6 (q, 2-Me) ppm; **HRMS** [ESI] *m/z* für C₇H₁₃NO₂SNa [M+Na]⁺ ber. 198.0565, gef. 198.0556.

S-(n-Butyryl)-N-acetylcysteamin (68c):

Der generellen Prozedur folgend wurde Buttersäure (350 mg, 4 mmol, 1 Äq.) zu Thioester **68c** (520 mg, 2.75 mmol, 69 %) umgesetzt, welcher nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EE = 1:2) als farbloses Öl erhalten wurde. *Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekannten Angaben überein.*¹⁶³

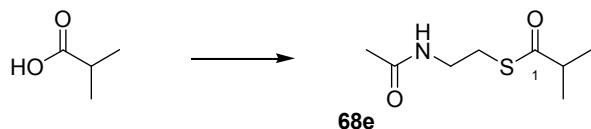
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 6.30 (bs, 1H, NH), 3.39-3.32 (m, 2H, NCH₂), 2.99-2.94 (m, 2H, CH₂S), 2.52-2.46 (m, 2H, 2-H), 1.91 (pseudo d, *J* = 1.7 Hz, 3H, NAc), 1.67-1.57 (m, 2H, 3-H), 0.93-0.86 (m, 3H, 3-Me) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 199.9 (s, C-1), 170.5 (s, NCOCH₃), 45.9 (t, C-2), 39.6 (t, NHCH₂), 28.4 (t, CH₂S), 23.1 (q, NCOCH₃), 19.2 (t, C-3), 13.4 (q, 3-Me) ppm; **HRMS** [ESI] *m/z* für C₈H₁₅NO₂SNa [M+Na]⁺ ber. 212.0721, gef. 212.0717.

¹⁶³ J. Patel, J. C. Hoyt, R. J. Parry, *Tetrahedron* **1998**, 54, 15927-15936.

S-(*n*-Valeroyl)-*N*-acetylcysteamin (**68d**):

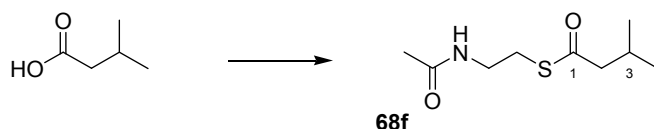
Der generellen Prozedur folgend wurde Valeriansäure (255 mg, 2.5 mmol, 1 Äq.) zu Thioester **68d** (265 mg, 1.3 mmol, 52 %) umgesetzt, welcher nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EE = 1:3) als gelbliches Öl erhalten wurde.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 5.80 (bs, 1H, NH), 3.43 (pseudo q, *J* = 6.1 Hz, 2H, NCH₂), 3.02 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, CH₂S), 2.58 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, 2-H), 1.96 (s, 3H, NAc), 1.65 (tt, *J* = 7.5, 7.5 Hz, 2H, 3-H), 1.35 (tq, *J* = 7.5, 7.3 Hz, 2H, 4-H), 0.92 (q, *J* = 7.3 Hz, 3H, 4-Me) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 200.5 (s, C-1), 170.4 (s, NCOCH₃), 44.0 (t, C-2), 39.9 (t, NHCH₂), 28.5 (t, CH₂S), 27.9 (t, C-3), 23.4 (q, NCOCH₃), 22.2 (t, C-4), 13.8 (q, 4-Me) ppm; **HRMS** [ESI] *m/z* für C₉H₁₇NO₂SNa [M+Na]⁺ ber. 226.0878, gef. 226.0874.

S-Isobutyryl-*N*-acetylcysteamin (**68e**):

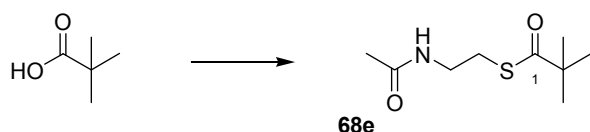
Der generellen Prozedur folgend wurde Isobuttersäure (350 mg, 4 mmol, 1 Äq.) zu Thioester **68e** (420 mg, 2.2 mmol, 55 %) umgesetzt, welcher nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EE = 1:2) als farbloses Öl erhalten wurde.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 6.38 (bs, 1H, NH), 3.38-3.30 (m, 2H, NCH₂), 2.97-2.91 (m, 2H, CH₂S), 2.73-2.64 (m, 1H, 2-H), 1.90 (pseudo d, *J* = 2.4 Hz, 3H, NAc), 1.14-1.09 (m, 6H, 2-Me₂) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 204.5 (s, C-1), 170.4 (s, NCOCH₃), 43.1 (d, C-2), 39.6 (t, NHCH₂), 28.1 (t, CH₂S), 23.1 (q, NCOCH₃), 19.3 (q, 2-Me₂) ppm; **HRMS** [ESI] *m/z* für C₈H₁₅NO₂SNa [M+Na]⁺ ber. 212.0721, gef. 212.0724.

S-Isovaleroyl-*N*-acetylcysteamin (**68f**):

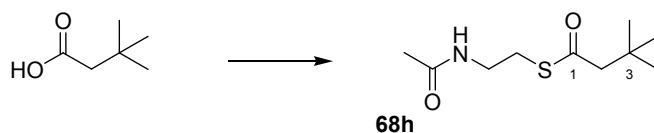
Der generellen Prozedur folgend wurde Isovaleriansäure (410 mg, 4 mmol, 1 Äq.) zu Thioester **68f** (730 mg, 3.6 mmol, 90 %) umgesetzt, welcher nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EE = 1:3) als gelbliches Öl erhalten wurde.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 5.84 (bs, 1H, NH), 3.43 (pseudo q, *J* = 6.2 Hz, 2H, NCH₂), 3.02 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, CH₂S), 2.45 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, 2-H), 2.22-2.12 (m, 1H, 3-H), 1.96 (s, 3H, NAc), 0.96 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H, 3-Me₂) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 199.9 (s, C-1), 170.4 (s, NCOCH₃), 53.0 (t, C-2), 40.0 (t, NHCH₂), 28.6 (t, CH₂S), 26.7 (d, 3-H), 23.4 (q, NCOCH₃), 22.4 (q, 2 * 3-Me) ppm; **HRMS** [ESI] *m/z* für C₉H₁₇NO₂SNa [M+Na]⁺ ber. 226.0878, gef. 226.0867.

S-Pivaloyl-*N*-acetylcysteamin (**68e**):

Der generellen Prozedur folgend wurde Pivalinsäure (256 mg, 2.5 mmol, 1 Äq.) zu Thioester **68e** (388 mg, 1.9 mmol, 76 %) umgesetzt, welcher nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EE = 1:2) als gelblicher Feststoff erhalten wurde.

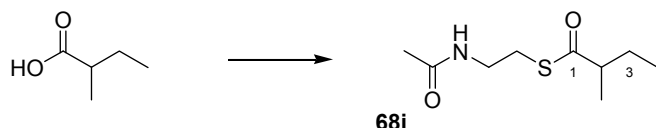
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 5.78 (bs, 1H, NH), 3.43 (pseudo q, *J* = 6.1 Hz, 2H, NCH₂), 3.00 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, CH₂S), 1.96 (s, 3H, NAc), 1.24 (s, 9H, 2-Me₃) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 203.8 (s, C-1), 170.9 (s, NCOCH₃), 83.2 (s, C-2), 40.0 (t, NHCH₂), 28.2 (t, CH₂S), 27.5 (q, 3 * 2-Me), 23.4 (q, NCOCH₃) ppm; **HRMS** [ESI] *m/z* für C₉H₁₇NO₂SNa [M+Na]⁺ ber. 226.0878, gef. 226.0880; **Smp.:** 43 °C.

S-(3,3-Dimethylbutyryl)-*N*-acetylcysteamin (**68h**):

Der generellen Prozedur folgend wurde 3,3-Dimethylbuttersäure (460 mg, 4 mmol, 1 Äq.) zu Thioester **68h** (740 mg, 3.4 mmol, 85 %) umgesetzt, welcher nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EE = 1:2) als gelbliches Öl erhalten wurde.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 5.83 (bs, 1H, NH), 3.43 (pseudo q, *J* = 6.0 Hz, 2H, NCH₂), 3.01 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, CH₂S), 2.46 (s, 2H, 2-H), 1.96 (s, 3H, NAc), 1.03 (s, 9H, 3-Me₃) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 199.0 (s, C-1), 170.3 (s, NCOCH₃), 57.0 (t, C-2), 40.0 (t, NHCH₂), 31.8 (s, C-3), 29.8 (q, 3 * 3-Me), 28.8 (t, CH₂S), 23.4 (q, NCOCH₃) ppm; **HRMS** [ESI] *m/z* für C₁₀H₁₉NO₂SNa [M+Na]⁺ ber. 240.1034, gef. 240.1034.

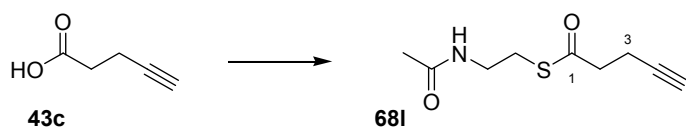
S-(*rac*-2-Methylbutyryl)-*N*-acetylcysteamin (**68i**):



Der generellen Prozedur folgend wurde *rac*-2-Methylbuttersäure (255 mg, 2.5 mmol, 1 Äq.) zu Thioester **68i** (276 mg, 1.4 mmol, 56 %) umgesetzt, welcher nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EE = 1:2) als farbloses Öl erhalten wurde.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 5.82 (bs, 1H, NH), 3.43 (pseudo q, *J* = 6.1 Hz, 2H, NCH₂), 3.00 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, CH₂S), 2.59 (qt, *J* = 6.9, 6.9 Hz, 1H, 2-H), 1.96 (s, 3H, NAc), 1.78-1.68 (m, 1H, 3-H_a), 1.54-1.43 (m, 1H, 3-H_b), 1.17 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, 2-Me), 0.92 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H, 3-Me) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 204.8 (s, C-1), 170.4 (s, NCOCH₃), 50.4 (d, C-2), 40.0 (t, NHCH₂), 28.2 (t, CH₂S), 27.3 (t, C-3), 23.4 (q, NCOCH₃), 17.3 (q, 2-Me), 11.7 (q, 3-Me) ppm; **HRMS** [ESI] *m/z* für C₉H₁₇NO₂SNa [M+Na]⁺ ber. 226.0878 gef. 226.0884.

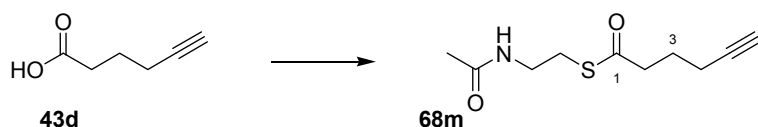
S-(Pent-4-inoyl)-*N*-acetylcysteamin (**68l**):



Der generellen Prozedur folgend wurde 4-Pentinsäure (**43c**) (400 mg, 4 mmol, 1 Äq.) zu Thioester **68l** (550 mg, 2.76 mmol, 69 %) umgesetzt, welcher nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EE = 1:2) als wachsartiger, farbloser Feststoff erhalten wurde.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 5.80 (bs, 1H, NH), 3.45 (pseudo q, *J* = 6.2 Hz, 2H, NCH₂), 3.06 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, CH₂S), 2.82 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, 2-H), 2.55 (dt, *J* = 2.6, 7.2 Hz, 2H, 3-H), 1.99 (t, *J* = 2.6 Hz, 5-H), 1.97 (s, 3H, NAc) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 198.1 (s, C-1), 170.4 (s, NCOCH₃), 81.9 (s, C-4), 69.7 (d, C-5), 42.5 (t, C-2), 39.7 (t, NHCH₂), 28.8 (t, CH₂S), 23.4 (q, NCOCH₃), 14.8 (t, C-3) ppm; **HRMS** [ESI] *m/z* für C₉H₁₃NO₂SNa [M+Na]⁺ ber. 222.0565 gef. 222.0561; **Smp.:** 30-37 °C.

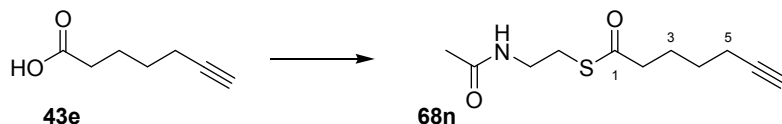
S-(Hex-5-in-oyl)-*N*-acetylcysteamin (**68m**):



Der generellen Prozedur folgend wurde 5-Hexinsäure (**43d**) (450 mg, 4 mmol, 1 Äq.) zu Thioester **68m** (410 mg, 1.9 mmol, 48 %) umgesetzt, welcher nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EE = 1:2) als wachsartiger farbloser Feststoff erhalten wurde.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 5.79 (bs, 1H, NH), 3.44 (pseudo q, *J* = 6.3 Hz, 2H, NCH₂), 3.04 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, CH₂S), 2.73 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, 2-H), 2.27 (dt, *J* = 2.6, 6.9 Hz, 2H, 4-H), 1.99 (t, *J* = 2.6 Hz, 6-H), 1.97 (s, 3H, NAc), 1.89 (tt, *J* = 7.5, 6.9 Hz, 2H, 3-H) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 199.5 (s, C-1), 170.4 (s, NCOCH₃), 83.0 (s, C-5), 69.6 (d, C-6), 42.7 (t, C-2), 39.8 (t, NHCH₂), 28.7 (t, CH₂S), 24.2 (t, C-3), 23.4 (q, NCOCH₃), 17.9 (t, C-4) ppm; **HRMS** [ESI] *m/z* für C₁₀H₁₅NO₂SNa [M+Na]⁺ ber. 236.0721, gef. 236.0726; **Smp.:** 25-30 °C.

S-(Hept-6-in-oyl)-*N*-acetylcysteamin (**68n**):



Der generellen Prozedur folgend wurde 6-Heptinsäure (**43e**) (500 mg, 4 mmol, 1 Äq.) zu Thioester **68n** (560 mg, 2.46 mmol, 62 %) umgesetzt, welcher nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EE = 1:2) als wachsartiger, farbloser Feststoff erhalten wurde.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 5.82 (bs, 1H, NH), 3.43 (pseudo q, *J* = 6.3 Hz, 2H, NCH₂), 3.03 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, CH₂S), 2.61 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, 2-H), 2.21 (dt, *J* = 2.6, 7.3 Hz, 2H, 5-H), 1.96 (s, 3H, NAc), 1.95 (t, *J* = 2.7 Hz, 7-H), 1.79 (tt, *J* = 7.6, 7.5

Hz, 2H, 3-H), 1.56 (tt, $J = 7.6, 7.3$ Hz, 2H, 4-H) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , $\text{CDCl}_3 = 77.16$ ppm): δ 199.9 (s, C-1), 170.4 (s, NCOCH_3), 83.8 (s, C-6), 69.0 (d, C-7), 43.6 (t, C-2), 39.8 (t, NHCH_2), 28.7 (t, CH_2S), 27.7 (t, C-4), 24.7 (t, C-3), 23.4 (q, NCOCH_3), 18.2 (t, C-5) ppm; **HRMS** [ESI] m/z für $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{NO}_2\text{SNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ber. 250.0878, gef. 250.0873; **Smp.**: 49 °C.

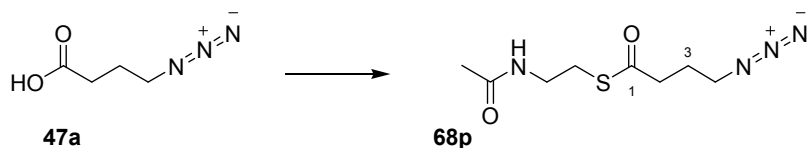
S-(2-(2-Propinyloxy)acetyl)-*N*-acetylcysteamin (**68o**):



Der generellen Prozedur folgend wurde 2-(2-Propinyloxy)essigsäure (**46**) (285 mg, 2.5 mmol, 1 Äq.) zu Thioester **68o** (128 mg, 0.6 mmol, 24 %) umgesetzt, welcher nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EE = 1:2) als gelbliches Öl erhalten wurde.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , $\text{CHCl}_3 = 7.26$ ppm): δ 5.81 (bs, 1H, NH), 4.32 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H, 3-H), 4.26 (s, 2H, 2-H), 3.44 (pseudo q, $J = 6.3$ Hz, 2H, NCH_2), 3.07 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H, CH_2S), 2.51 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, 5-H), 1.97 (s, 3H, NAc) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , $\text{CDCl}_3 = 77.16$ ppm): δ 199.4 (s, C-1), 170.4 (s, NCOCH_3), 78.2 (s, C-4), 76.2 (d, C-5), 74.0 (t, C-2), 59.1 (t, C-3), 39.5 (t, NHCH_2), 27.8 (t, CH_2S), 23.4 (q, NCOCH_3) ppm; **HRMS** [ESI] m/z für $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{NO}_3\text{SNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ber. 238.0514, gef. 238.0518.

S-(4-Azido-*n*-butyryl)-*N*-acetylcysteamin (**68p**):

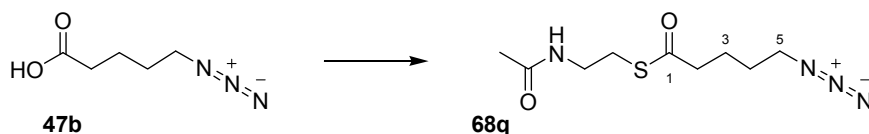


Der generellen Prozedur folgend wurde 4-Azidobuttersäure (**47a**) (520 mg, 4 mmol, 1 Äq.) zu Thioester **68p** (680 mg, 2.95 mmol, 74 %) umgesetzt, welcher nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EE = 1:2) als gelbliches Öl erhalten wurde.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , $\text{CHCl}_3 = 7.26$ ppm): δ 5.82 (bs, 1H, NH), 3.44 (pseudo q, $J = 6.3$ Hz, 2H, NCH_2), 3.35 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, 4-H), 3.04 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, CH_2S), 2.68 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, 2-H), 1.97 (s, 3H, NAc), 1.94 (tt, $J = 7.3, 6.5$ Hz, 2H, 3-H) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , $\text{CDCl}_3 = 77.16$ ppm): δ 199.0 (s, C-1), 170.4 (s, NCOCH_3), 50.5 (t, C-4),

40.9 (t, C-2), 39.7 (t, NHCH₂), 28.8 (t, CH₂S), 24.9 (t, C-3), 23.4 (q, NCOCH₃) ppm; **HRMS** [ESI] m/z für C₈H₁₄N₄O₂SNa [M+Na]⁺ ber. 253.0735, gef. 253.0735.

S-(5-Azido-*n*-valeroyl)-*N*-acetylcysteamin (**68q**):



Der generellen Prozedur folgend wurde 5-Azidovaleriansäure (**47b**) (570 mg, 4 mmol, 1 Äq.) zu Thioester **68q** (680 mg, 2.78 mmol, 70 %) umgesetzt, welcher nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EE = 1:2) als gelbliches Öl erhalten wurde.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 5.80 (bs, 1H, NH), 3.44 (pseudo q, J = 6.2 Hz, 2H, NCH₂), 3.30 (t, J = 6.7 Hz, 2H, 5-H), 3.03 (t, J = 6.3 Hz, 2H, CH₂S), 2.62 (t, J = 7.3 Hz, 2H, 2-H), 1.97 (s, 3H, NAc), 1.81-1.71 (m, 2H, 3-H), 1.68-1.59 (m, 2H, 4-H) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 199.6 (s, C-1), 170.4 (s, NCOCH₃), 51.5 (t, C-5), 43.4 (t, C-2), 39.8 (t, NHCH₂), 28.7 (t, CH₂S), 28.2 (t, C-4), 23.4 (q, NCOCH₃), 22.9 (t, C-3) ppm; **HRMS** [ESI] m/z für C₉H₁₆N₄O₂SNa [M+Na]⁺ ber. 267.0892, gef. 267.0898.

S-(6-Azido-*n*-caproyl)-*N*-acetylcysteamin (**68r**):



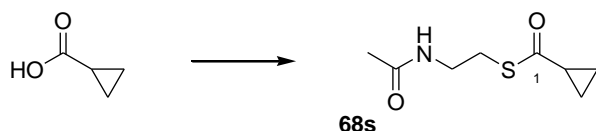
Der generellen Prozedur folgend wurde 6-Azidocapronsäure¹⁶⁴ (393 mg, 2.5 mmol, 1 Äq.) zu Thioester **68r** (116 mg, 0.45 mmol, 18 %) umgesetzt, welcher nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EE = 1:2) als gelbliches Öl erhalten wurde.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 5.80 (bs, 1H, NH), 3.43 (pseudo q, J = 6.3 Hz, 2H, NCH₂), 3.28 (t, J = 7.1 Hz, 2H, 6-H), 3.03 (t, J = 6.5 Hz, 2H, CH₂S), 2.60 (t, J = 7.4 Hz, 2H, 2-H), 1.97 (s, 3H, NAc), 1.70 (tt, J = 7.6, 7.4 Hz, 2H, 3-H), 1.61 (tt, J = 7.3, 7.1 Hz, 2H, 5-H), 1.46-1.38 (m, 2H, 4-H) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 199.9 (s, C-1), 170.4 (s, NCOCH₃), 51.3 (t, C-6), 43.9 (t, C-2), 39.8 (t, NHCH₂), 28.7

¹⁶⁴ 6-Azidocapronsäure wurde durch Yi Su bereitgestellt.

(t, CH₂S), 28.7 (t, C-5), 26.2 (t, C-3/5), 25.2 (t, C-3/5), 23.4 (q, NCOCH₃) ppm; **HRMS** [ESI] m/z für C₁₀H₁₈N₄O₂SNa [M+Na]⁺ ber. 281.1048, gef. 281.1039.

S-Cyclopropancarbonyl-*N*-acetylcysteamin (**68s**):



Der generellen Prozedur folgend wurde Cyclopropancarbonsäure (215 mg, 2.5 mmol, 1 Äq.) zu Thioester **68s** (159 mg, 0.85 mmol, 34 %) umgesetzt, welcher nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EE = 1:2) als farbloser Feststoff erhalten wurde. *Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekannten Angaben überein.*¹⁶³

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 5.85 (bs, 1H, NH), 3.43 (pseudo q, J = 6.0 Hz, 2H, NCH₂), 3.04 (t, J = 6.3 Hz, 2H, CH₂S), 2.07-2.01 (m, 1H, 2-H), 1.96 (s, 3H, NAc), 1.19-1.15 (m, 2 * 1H, 2 * 3-H_a), 1.01-0.96 (m, 2 * 1H, 2 * 3-H_b) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 200.1 (s, C-1), 170.4 (s, NCOCH₃), 40.0 (t, NHCH₂), 28.7 (t, CH₂S), 23.4 (q, NCOCH₃), 22.9 (d, C-2), 11.3 (t, 2 * C-3) ppm; **HRMS** [ESI] m/z für C₈H₁₃NO₂SNa [M+Na]⁺ ber. 210.0565, gef. 210.0577; **Smp.:** 35 °C.

S-Cyclobutancarboxyl-*N*-acetylcysteamin (**68t**):



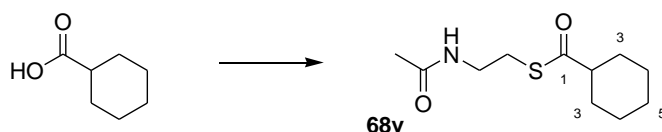
Der generellen Prozedur folgend wurde Cyclobutancarbonsäure (250 mg, 2.5 mmol, 1 Äq.) zu Thioester **68t** (204 mg, 1.0 mmol, 41 %) umgesetzt, welcher nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EE = 1:2) als gelbliches Öl erhalten wurde.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 5.82 (bs, 1H, NH), 3.44 (pseudo q, J = 6.0 Hz, 2H, NCH₂), 3.41-3.33 (m, 1H, 2H), 3.02 (t, J = 6.3 Hz, 2H, CH₂S), 2.37-2.17 (m, 2 * 2H, 2 * 3-H_{a/b}), 2.05-1.83 (m, 2H, 4-H_{a/b}), 1.96 (s, 3H, NAc) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 202.3 (s, C-1), 170.4 (s, NCOCH₃), 47.0 (d, C-2), 40.0 (t, NHCH₂), 28.4 (t, CH₂S), 26.2 (t, 2 * C-3), 23.4 (q, NCOCH₃), 18.1 (d, C-4) ppm; **HRMS** [ESI] m/z für C₉H₁₆NO₂S [M+H]⁺ ber. 202.0902, gef. 202.0905.

S-Cyclopentancarbonyl-*N*-acetylcysteamin (**68u**):

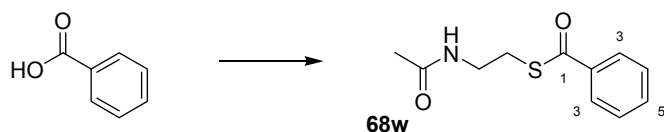
Der generellen Prozedur folgend wurde Cyclopentancarbonsäure (285 mg, 2.5 mmol, 1 Äq.) zu Thioester **68u** (323 mg, 1.5 mmol, 60 %) umgesetzt, welcher nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EE = 1:2) als gelbliches Öl erhalten wurde.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 5.82 (bs, 1H, NH), 3.44 (pseudo q, *J* = 6.2 Hz, 2H, NCH₂), 3.02 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, CH₂S), 3.01-2.96 (m, 1H, 2-H), 1.96 (s, 3H, NAc), 1.94-1.57 (m, 2 * 4H, 2 * {3-H_{a/b} & 4-H_{a/b}}) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 203.9 (s, C-1), 170.4 (s, NCOCH₃), 53.4 (d, C-2), 40.0 (t, NHCH₂), 30.8 (t, 2 * C-3), 28.4 (t, CH₂S), 26.0 (t, 2 * C-4), 23.4 (q, NCOCH₃) ppm; **HRMS** [ESI] *m/z* für C₁₀H₁₇NO₂SNa [M+Na]⁺ ber. 238.0878, gef. 238.0883.

S-Cyclohexancarbonyl-*N*-acetylcysteamin (**68v**):

Der generellen Prozedur folgend wurde Cyclohexancarbonsäure (321 mg, 2.5 mmol, 1 Äq.) zu Thioester **68v** (360 mg, 1.57 mmol, 63 %) umgesetzt, welcher nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EE = 1:2) als gelbliches Öl erhalten wurde.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 5.81 (bs, 1H, NH), 3.42 (pseudo q, *J* = 6.2 Hz, 2H, NCH₂), 3.00 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, CH₂S), 2.50 (tt, *J* = 11.5, 3.5 Hz, 1H, 2-H), 1.95 (s, 3H, NAc), 1.94-1.87 (m, 2H, Cyclohexyl-CH_aH_b), 1.82-1.75 (m, 2H, Cyclohexyl-CH_aH_b), 1.69-1.63 (m, 1H, 5-H_a), 1.51-1.40 (m, 2H, Cyclohexyl-CH_aH_b), 1.34-1.18 (m, 3H, Cyclohexyl-CH_aH_b & 5-H_b) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 204.0 (s, C-1), 170.3 (s, NCOCH₃), 52.9 (d, C-2), 40.0 (t, NHCH₂), 29.7 (t, 2 * C-3), 28.2 (t, CH₂S), 25.7 (t, C-5), 25.6 (t, 2 * C-4), 23.4 (q, NCOCH₃) ppm; **HRMS** [ESI] *m/z* für C₁₁H₁₉NO₂SNa [M+Na]⁺ ber. 252.1034, gef. 252.1041.

S-Benzoyl-*N*-acetylcysteamin (**68w**):

Der generellen Prozedur folgend wurde Benzoesäure (305 mg, 2.5 mmol, 1 Äq.) zu Thioester **68w** (418 mg, 1.87 mmol, 75 %) umgesetzt, welcher nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EE = 1:3) als farbloser Feststoff erhalten wurde. *Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekannten Angaben überein.*¹⁶⁵

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 8.00-7.93 (m, 2 * 1H, 2 * 3-H), 7.63-7.56 (m, 1H, 5-H), 7.51-7.42 (m, 2 * 1H, 2 * 4-H), 5.90 (bs, 1H, NH), 3.54 (pseudo q, *J* = 6.2 Hz, 2H, NCH₂), 3.24 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, CH₂S), 1.98 (s, 3H, NAc) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 192.5 (s, C-1), 170.5 (s, NCOCH₃), 136.8 (s, C-2), 133.9 (d, C-5), 128.9 (d, 2 * C-4), 127.5 (d, 2 * C-3), 39.9 (t, NHCH₂), 28.7 (t, CH₂S), 23.4 (q, NCOCH₃) ppm; **HRMS** [ESI] *m/z* für C₁₁H₁₃NO₂SNa [M+Na]⁺ ber. 246.0549 gef. 246.0565; **Smp.:** 86 °C (Lit. 84.5-85.0 °C).

S-(4-Iodobenzoyl)-*N*-acetylcysteamin (**68x**):

Der generellen Prozedur folgend wurde 4-Iodobenzoesäure (358 mg, 2.5 mmol, 1 Äq.) zu Thioester **68x** (434 mg, 1.24 mmol, 50 %) umgesetzt, welcher nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EE = 1:3) als farbloser Feststoff erhalten wurde.

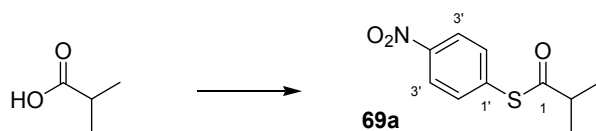
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 7.85-7.81 (m, 2 * 1H, 2 * 4-H), 7.69-7.65 (m, 2 * 1H, 2 * 3-H), 5.84 (bs, 1H, NH), 3.53 (pseudo q, *J* = 6.2 Hz, 2H, NCH₂), 3.23 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, CH₂S), 1.98 (s, 3H, NAc) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 191.7 (s, C-1), 170.4 (s, NCOCH₃), 138.2 (d, 2 * C-4), 136.1 (s, C-2), 128.7 (d, 2 * C-3), 101.7 (s, C-5), 39.7 (t, NHCH₂), 28.9 (t, CH₂S), 23.4 (q, NCOCH₃) ppm; **HRMS** [ESI] *m/z* für C₁₁H₁₂INO₂SNa [M+Na]⁺ ber. 371.9531, gef. 371.9527; **Smp.:** 138 °C.

¹⁶⁵ E. Leete, J. A. Bjorklund, H. K. Sung, *Phytochemistry* **1988**, 27, 2553-2556.

***S*-(Prop-2-in-oyl)-*N*-acetylcysteamin (68j)**¹²¹

Propiolsäure (70 mg, 1 mmol, 1 Äq.) wurde unter Argonatmosphäre in 3 mL CH₂Cl₂ gelöst und auf -5 °C gekühlt (Aceton-Eis-Bad) mit DCC (248 mg, 1.2 mmol, 1.2 Äq.) versetzt. Nach Zugabe von *N*-Acetylcysteamin (119 mg, 1 mmol, 1.0 Äq.) wurde die Kühlung entfernt und die Reaktionsmischung für 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Aufarbeitung erfolgte entsprechend der generellen Methode zur Synthese der Thioester **68b-i/l-x**. Nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EE = 1:2) wurde Thioester **68j** (30 mg, 0.18 mmol, 18 %) als gelbliches Öl erhalten. *Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekannten Angaben überein.*

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 5.80 (bs, 1H, NH), 3.48 (pseudo q, *J* = 6.3 Hz, 2H, NCH₂), 3.39 (s, 1H, 3-H), 3.16 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, CH₂S), 1.98 (s, 3H, NAc) ppm;
HRMS [ESI] *m/z* für C₇H₉NO₂SNa [M+Na]⁺ ber. 194.0247, gef. 194.0252.

***S*-Isobutyryl-4-nitrothiophenol (69a)**

In einer Abwandlung der generellen Prozedur für die Synthese der Thioester **68b-i/l-x** wurde Isobuttersäure (220 mg, 2.5 mmol, 1.0 Äq.) mit 4-Nitrothiophenol (465 mg, 3 mmol, 1.2 Äq.) an Stelle von *N*-Acetylcysteamin zu Thioester **69a** (309 mg, 1.37 mmol, 55 %) umgesetzt, welcher nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EE = 3:1) als gelbes Öl erhalten wurde.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 8.26-8.23 (m, 2 * 1H, 2 * 3'-H), 7.61-7.58 (m, 2 * 1H, 2 * 2'-H), 2.89 (sep, *J* = 7.1 Hz, 1H, 2-H), 1.30 (d, *J* = 7.1 Hz, 6H, 2-Me₂) ppm;
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 199.8 (s, C-1), 148.2 (s, C-4'), 136.7 (s, C-1'), 135.1 (d, 2 * C-2'), 124.0 (d, 2 * C-3'), 43.7 (d, C-2), 19.4 (q, 2 * 2-Me) ppm;
HRMS [ESI] *m/z* für C₁₀H₁₂NO₃S [M+H]⁺ ber. 226.0538, gef. 226.0544.

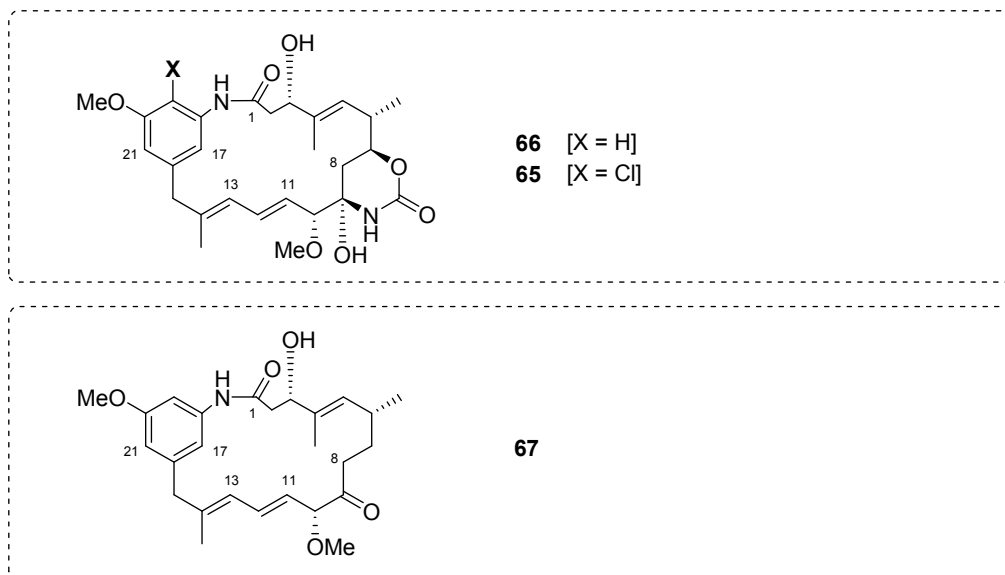
S-(Hex-5-in-oyl)-4-nitrothiophenol (69b)

In einer Abwandlung der generellen Prozedur für die Synthese der Thioester **68b-i/l-x** wurde 5-Hexinsäure (280 mg, 2.5 mmol, 1.0 Äq.) mit 4-Nitrothiophenol (465 mg, 3 mmol, 1.2 Äq.) an Stelle von *N*-Acetylcysteamin zu Thioester **69b** (119 mg, 0.48 mmol, 19 %) umgesetzt, welcher nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EE = 4:1) als gelbes Öl erhalten wurde.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 8.29-8.21 (m, 2 * 1H, 2 * 3'-H), 7.65-7.55 (m, 2 * 1H, 2 * 2'-H), 2.88 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, 2-H), 2.32 (dt, *J* = 2.6, 6.8 Hz, 2H, 4-H), 2.02 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H, 6-H), 1.94 (tt, *J* = 7.2, 6.8 Hz, 2H, 3-H) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm): δ 194.8 (s, C-1), 148.3 (s, C-4'), 136.3 (s, C-1'), 134.8 (d, 2 * C-2'), 124.1 (d, 2 * C-3'), 82.9 (s, C-5), 69.9 (d, C-6), 42.7 (t, C-2), 24.0 (t, C-3), 17.8 (t, C-4) ppm; **HRMS** [ESI] *m/z* für C₁₂H₁₂NO₃S [M+H]⁺ ber. 250.0538, gef. 250.0541.

6.10 Mutasyntesen aus Kapitel 4.1.5

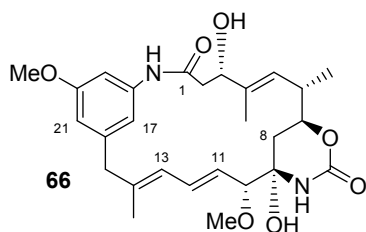
20-*O*-Methylproansamitocin-Derivate 65-67



Die Fermentation von *A. pretiosum* HGF052 erfolgte nach dem unter 6.2 beschriebenen Fermentationsprotokoll, gefolgt von extraktiver Aufarbeitung. Die vereinigten Rohextrakte aus insgesamt 960 mL Kulturbrühe wurden der tabellarisch aufgeführten chromatographischen Reinigung unterzogen (*vide infra*), die massenspektrometrisch verfolgt wurde. Die Derivate **66** (2.8 mg, 5.6 μ mol, 2.9 mg/L), **65** (23.7 mg, 44.3 μ mol, 24.7 mg/L) und **67** (0.7 mg, 1.6 μ mol, 0.7 mg/L) konnten als farblose Feststoffe isoliert werden. *Den quartären Kohlenstoffen C-18 und C-19 der Verbindung 65, sowie C-18 der Verbindung 66 konnten keine Signale zugewiesen, was in der nachfolgenden Niederschrift durch den Vermerk n.b. (nicht bestimmt) verdeutlicht wird.*

Tabelle: Chromatographische Reinigung der Ansamitocin-Derivate **65-67**.

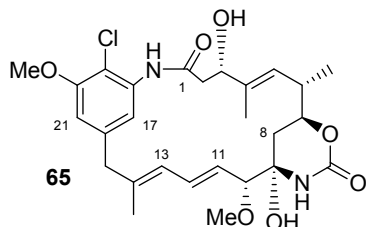
PROBE	SYSTEM (KAP. 6.1)	ELUTIONSBEDINGUNGEN	FRAKTIONEN
Rohextrakt	SiO ₂	PE:EE 4:1 → EE	F-1 (R _f (EE) 0.4-0.05)
F-1	Sephadex LH-20	MeOH	F-2 (M _R = 400-700 Da)
F-2	C18-P _[B]	H ₂ O[+ 0.1% FA]:MeOH[+ 0.1% FA] [A:B], Flussrate = 15 mL/min Gradient (t [min]/B [%]): (0/20) (5/20) (90/100)	F-3 (t _R = 62.0-64.0 min) F-4 (t _R = 64.0-65.0 min) F-5 (t _R = 65.0-66.0 min)
F-3	CN-SP	H ₂ O:MeCN [A:B], Flussrate = 2.5 mL/min Gradient (t [min]/B [%]): (0/5) (5/5) (45/18) (80/35) (90/50)	65 (t _R = 76.5 min)
F-4	CN-SP	H ₂ O:MeCN [A:B], Flussrate = 2.5 mL/min Gradient (t [min]/B [%]): (0/5) (5/5) (45/18) (80/35) (90/50)	67 (t _R = 69.5 min) 66 (t _R = 74.0 min) 65 (t _R = 77.5 min)
F-5	CN-SP	H ₂ O:MeCN [A:B], Flussrate = 2.5 mL/min Gradient (t [min]/B [%]): (0/5) (5/5) (45/18) (80/35) (90/50)	66 (t _R = 73.0 min)

7-*O*-Carbamoyl-20-*O*-methylproansamitocin **66**:

¹H-NMR (400 MHz, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 7.60 (s, 1H, 17-H), 6.63 (dd, *J* = 15.6, 10.7 Hz, 1H, 12-H), 6.54 (s, 1H, 21-H), 6.45 (s, 1H, 19-H), 6.10 (d, *J* = 10.7 Hz, 1H, 13-H), 5.57 (dd, *J* = 15.6, 9.2 Hz, 1H, 11-H), 5.46 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, 5-H), 4.29 (bdd, *J* = 11.6, 10.4 Hz, 1H, 7-H), 4.22 (bd, *J* = 6.5 Hz, 1H, 3-H), 3.77 (s, 3H, 20-OMe), 3.56 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H, 10-H), 3.41 (d, *J* = 13.8 Hz, 1H, 15-H_a), 3.34 (s, 3H, 10-OMe), 3.15 (d, *J* = 13.8 Hz, 1H, 15-H_b), 2.81 (dd, *J* = 15.7, 2.7 Hz, 1H, 2-H_a), 2.72 (dd, *J* = 15.7, 6.5 Hz, 1H, 2-H_b), 2.70-2.59 (m, 1H, 6-H), 1.96 (bd, *J* = 14.1 Hz, 1H, 8-H_a), 1.68 (s, 3H, 14-Me), 1.65 (s, 3H, 4-Me), 1.43 (dd, *J* = 14.1, 11.6 Hz, 1H, 8-H_b), 1.14 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, 6-Me) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.00 ppm): δ 171.6 (s, C-1), 161.3 (s, C-20), 156.0 (s, 7-OCONH), 143.5 (s, C-16), 140.9 (s, C-14), n.b. (s, C-18), 139.1 (s, C-4), 135.0 (d, C-12), 127.9 (d, C-13), 126.7 (d, C-11), 125.8 (d, C-5), 113.1 (d, C-17), 111.8 (d, C-21), 103.3 (d, C-19), 89.2 (d, C-10), 82.5 (s, C-9), 79.7 (d, C-7), 73.3 (d, C-3), 56.4 (q, 10-OMe), 55.7 (q, 20-OMe), 46.8 (t, C-15), 41.0 (t, C-2), 38.4 (d, C-6), 36.2 (t, C-8), 18.0 (q, 6-Me),

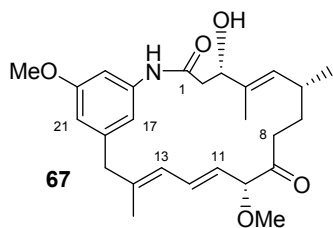
16.7 (q, 14-Me), 15.0 (q, 4-Me) ppm; **UPLC-MS** [MeOH] t_R = 2.39 min; **HRMS** [ESI] m/z für $C_{27}H_{36}N_2O_7Na$ $[M+Na]^+$: ber. 523.2420, gef. 523.2429.

N-Demethyl-4,5-deepoxy-maytansinol **65**:



1H -NMR (400 MHz, Methanol- d_4 , CHD_2OD = 3.31 ppm): δ 7.00-6.68 (m, 2H, 2 * Ar-H), 6.63 (bdd, J = 14.8, 10.8 Hz, 1H, 12-H), 6.10-5.84 (m, 1H, 13-H), 5.59-5.45 (m, 1H, 11-H), 5.48-5.35 (m, 1H, 5-H), 4.36-4.26 (m, 1H, 7-H), 4.28-4.21 (m, 1H, 3-H), 3.90 (bs, 3H, 20-OMe), 3.57 (d, J = 9.2 Hz, 1H, 10-H), 3.44 (d, J = 14.3 Hz, 1H, 15- H_a), 3.34 (s, 3H, 10-OMe), 3.25 (d, J = 14.3 Hz, 1H, 15- H_b), 3.06-2.65 (m, 2H, 2-H), 2.69-2.55 (m, 1H, 6-H), 1.76 (bs, 3H, 14-Me), 1.73-1.63 (m, 3H, 4-Me), 1.48-1.30 (m, 2H, 8-H), 1.13 (d, J = 6.5 Hz, 3H, 6-Me) ppm; **^{13}C -NMR** (100 MHz, Methanol- d_4 , Methanol- d_4 = 49.00 ppm): δ 171.4 (s, C-1), 156.6 (s, C-20), 155.9 (s, 7- $CONH$), 141.2 (s, C-16), 139.2 (s, C-14), n.b. (s, C-18), 137.0 (s, C-4), 134.5 (d, C-12), 128.5 (d, C-13), 127.2 (d, C-11), 125.1 (d, C-5), n.b. (s, C-19), 115.7 (d, C-17), 110.1 (d, C-21), 89.0 (d, C-10), 82.3 (s, C-9), 79.6 (d, C-7), 72.9 (d, C-3), 56.9 (q, 20-OMe), 56.6 (q, 10-OMe), 46.4 (t, C-15), 40.9 (t, C-2), 38.5 (d, C-6), 36.2 (t, C-8), 17.9 (q, 6-Me), 17.0 (q, 14-Me), 15.0 (q, 4-Me) ppm; **UPLC-MS** [MeOH] t_R = 2.37 min; **HRMS** [ESI] m/z für $C_{27}H_{36}ClN_2O_7$ $[M+H]^+$: ber. 535.2211, gef. 535.2218.

7-Desoxy-20-*O*-methylproansamitocin **67**:



1H -NMR (500 MHz, Methanol- d_4 , CHD_2OD = 3.31 ppm): δ 6.93 (dd, J = 1.9, 1.9 Hz, 1H, 17-H), 6.81 (ddd, J = 15.2, 10.9, 0.8 Hz, 1H, 12-H), 6.70 (dd, J = 1.9, 1.9 Hz, 1H, 19-H), 6.56 (dd, J = 1.9, 1.9 Hz, 1H, 21-H), 6.05 (d, J = 10.9 Hz, 1H, 13-H), 5.34 (dd, J = 15.2, 7.9 Hz, 1H, 11-H), 5.09 (dq, J = 9.1, 1.1 Hz, 1H, 5-H), 4.47 (d, J = 7.9 Hz, 1H, 10-H), 4.33 (dd, J = 9.9, 5.1 Hz, 1H, 3-H), 3.77 (s, 3H, 20-OMe), 3.33 (d, J = 13.3 Hz, 1H, 15- H_a), 3.32 (s, 3H, 10-OMe), 3.17 (d, J = 13.3 Hz, 1H, 15- H_b), 2.60 (dd, J = 12.6, 5.1 Hz, 1H, 2- H_a), 2.58 (ddd,

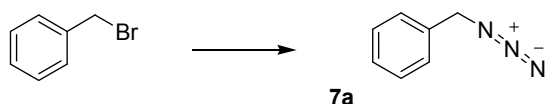
$J = 15.9, 9.8, 5.7$ Hz, 1H, 8-H_a), 2.56 (dd, $J = 12.6, 9.9$ Hz, 1H, 2-H_b), 2.31 (ddd, $J = 15.9, 5.9, 5.6$ Hz, 1H, 8-H_b), 1.98 (dddq, $J = 10.2, 9.1, 3.6, 6.5$ Hz, 1H, 6-H), 1.82 (dddd, $J = 13.6, 9.8, 5.9, 3.6$ Hz, 1H, 7-H_a), 1.71 (d, $J = 1.1$ Hz, 3H, 14-Me), 1.63 (d, $J = 1.1$ Hz, 3H, 4-Me), 1.17 (dddd, $J = 13.6, 10.2, 5.7, 5.6$ Hz, 1H, 7-H_b), 0.49 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, 6-Me) ppm; **¹³C-NMR** (125 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.00 ppm): δ 210.1 (s, C-9), 171.2 (s, C-1), 161.2 (s, C-20), 143.0 (s, C-16), 142.2 (s, C-14), 140.2 (s, C-18), 135.3 (s, C-4), 134.4 (d, C-5), 133.7 (d, C-12), 126.5 (d, C-13), 126.0 (d, C-11), 114.5 (d, C-17), 112.5 (d, C-21), 105.7 (d, C-19), 89.1 (d, C-10), 76.2 (d, C-3), 56.9 (q, 10-OMe), 55.7 (q, 20-OMe), 47.1 (t, C-15), 44.5 (t, C-2), 36.8 (t, C-8), 32.6 (t, C-7), 32.0 (d, C-6), 19.5 (q, 6-Me), 16.7 (q, 14-Me), 11.3 (q, 4-Me) ppm; **UPLC-MS** [MeOH] $t_R = 2.45$ min; **HRMS** [ESI] m/z für C₂₆H₃₅NO₅Na [M+Na]⁺: ber. 464.2413, gef. 464.2404.

6.11 Synthese der Verbindungen aus Kapitel 4.1.6

Generelle Vorschrift zur Synthese der Benzylazide **77a-c**

Benzylbromid (0.2 mmol, 1 Äq.) wird unter Argonatmosphäre in DMF (0.5 mL) gelöst mit Natriumazid (1 mmol, 5 Äq. pro Benzylbromid) versetzt und für 16 Stunden bei 85 °C gerührt. Der Reaktionsansatz wird mit Wasser auf 8 mL verdünnt, dreimal mit CH₂Cl₂ extrahiert, getrocknet (MgSO₄), *in vacuo* eingengt und einer säulenchromatographischen Reinigung (PE:EE = 50:1) unterzogen.

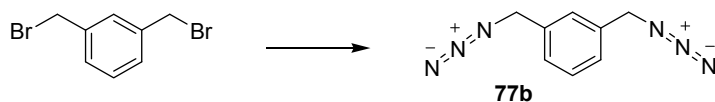
Benzylazid (**77a**):



Der generellen Prozedur folgend wurde Benzylbromid (129 mg, 0.75 mmol, 1 Äq.) zu Benzylazid **77a** (81 mg, 0.61 mmol, 81 %) umgesetzt, welches als dünnflüssiges, gelbliches Öl erhalten wurde. *Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekannten Angaben überein.*¹⁶⁶

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 7.44-7.29 (m, 5H, 5 * H-Ar), 4.35 (s, 2H, CH₂N₃) ppm.

1,3-Bis(azidomethyl)benzen (**77b**):



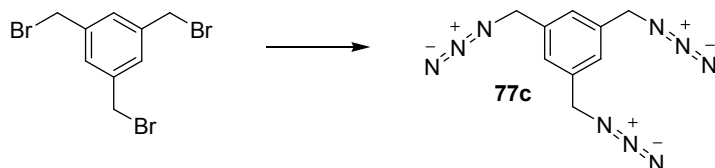
Der generellen Prozedur folgend wurde *m*-Xylylendibromid (145 mg, 0.55 mmol, 1 Äq.) zu Benzylazid **77b** (103 mg, 0.55 mmol, 99 %) umgesetzt, welches als gelbliches Öl erhalten wurde. *Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekannten Angaben überein.*¹⁶⁷

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): 7.44-7.39 (m, 1H, H-Ar), 7.32-7.27 (m, 3H, 3 * H-Ar), 4.38 (s, 4H, 2 * CH₂N₃) ppm.

¹⁶⁶ S. G. Alvarez, M. T. Alvarez, *Synthesis* **1997**, 413-414.

¹⁶⁷ J. R. Thomas, X. Liu, P. J. Hergenrother, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12434-12435.

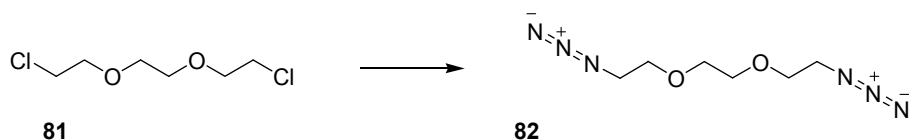
1,3,5-Tris(azidomethyl)benzen (**77c**):



Der generellen Prozedur folgend wurde 1,3,5-Tris(bromomethyl)benzen (71 mg, 0.2 mmol, 1 Äq.) zu Benzylazid **77c** (49 mg, 0.2 mmol, quant.) umgesetzt, welches als bräunliches Öl erhalten wurde. *Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekannten Angaben überein.*¹⁶⁸

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 7.25 (s, 3H, 3 * H-Ar), 4.40 (s, 6H, 3 * CH₂N₃) ppm.

1,2-Bis(2-azidoethoxy)ethan (**82**)

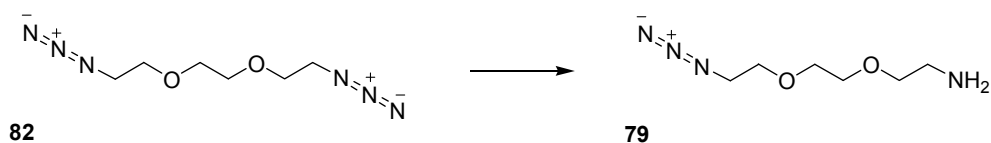


1,2-Bis(2-chlorethoxy)ethan (**81**) (348 mg, 1.86 mmol, 1.0 Äq.) wurde in DMF (3 mL) unter Argonatmosphäre gelöst mit Natriumazid (254 mg, 3.9 mmol, 2.1 Äq.) sowie einer Spatelspitze Natriumiodid (kat.) versetzt und 48 Stunden bei 60 °C gerührt. Der Reaktionsmischung wurde NaN₃ hinzugefügt (180.5 mg, 2.8 mmol, 1.5 Äq.) und 48 Stunden bei 80 °C bis zum vollständigen Umsatz (Kontrolle per Dünnschichtchromatographie, EE) gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit Wasser verdünnt und fünfmal mit CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden getrocknet (MgSO₄) und *in vacuo* eingengt. Diazid **82** (357 mg, 1.78 mmol, 96 %) wurde nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EE = 3:1) als blass-gelbliches Öl erhalten. *Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekannten Angaben überein.*¹⁶⁹

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 3.69 (bt, *J* = 5.1 Hz, 4H, (N₃CH₂CH₂OCH₂)₂), 3.68 (s, 4H, (N₃CH₂CH₂OCH₂)₂), 3.39 (bt, *J* = 5.1 Hz, 4H, (N₃CH₂CH₂OCH₂)₂) ppm.

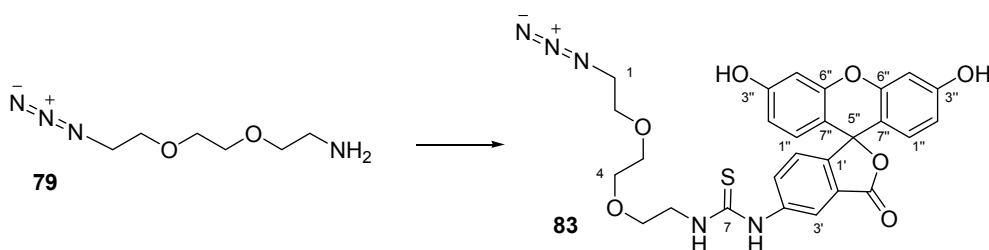
¹⁶⁸ Y. Song, E. K. Kohlmeir, T. J. Meade, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 6662-6663.

¹⁶⁹ M. J. Joralemon, R. K. O'Reilly, J. B. Matson, A. K. Nugent, C. G. Hawker, K. L. Wooley, *Macromolecules* **2005**, 38, 5436-5443.

2-[2-(2-Azidoethoxy)ethoxy]ethanamin (79)

Nach literaturbekanntem Verfahren¹⁷⁰ wurde Diazid **82** (200 mg, 1 mmol, 1.1 Äq.) durch Reduktion mit Triphenylphosphin (236 mg, 0.9 mmol, 1.0 Äq.) in biphasischem, saurem Milieu (0.1 M H₃PO₄/Et₂O) desymmetrisiert. Amin **79** (83 mg, 0.48 mmol, 53 %) wurde nach extraktiver Aufarbeitung als farbloses Öl erhalten. *Die analytischen Daten stimmen mit den literaturbekannten Angaben überein.*¹⁷¹

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7.26 ppm): δ 3.72-3.62 (m, 6H, 3 * CH₂O), 3.52 (t, *J* = 5.3 Hz, 2H, OCH₂CH₂NH₂), 3.39 (bt, *J* = 5.3 Hz, 2H, CH₂N₃), 2.87 (bt, *J* = 5.3 Hz, 2H, OCH₂CH₂NH₂), 1.44 (bs, 2H, OCH₂CH₂NH₂) ppm.

N-(Fluorescein-5-yl)-N'-{2-[2-(2-azidoethoxy)ethoxy]ethyl}thioharnstoff (83)

Fluorescein-5-isothiocyanat (19.4 mg, 50 μmol, 1.0 Äq.) wurde unter Lichtausschluß und Argonatmosphäre in MeCN (2 mL) gelöst mit Amin **79** (10.5 mg, 60 μmol, 1.2 Äq.) sowie DIPEA (25 μL, 250 μmol, 5 Äq.) versetzt. Der Suspension wurde MeOH (3 mL) hinzugefügt und die resultierende Lösung bis zum vollständigen Umsatz (Kontrolle per Massenspektrometrie) bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde *in vacuo* eingengt und einer chromatographischen Reinigung via *reversed phase*-HPLC (*vide infra*) unterzogen. Fluorescein-Linker-Konstrukt **83** wurde in chinoider Diaminsalz-Form mit DIPEA und Amin **79** als dunkel-oranger, amorpher Feststoff erhalten (30 mg; Indikativ: ¹³C-Signal von C-3'' – δ_C 179.6 ppm).¹³¹ Durch erneute Reinigung des Organosalzes unter Zusatz von Säure konnte Substanz **83** (22.5 mg, 39.9 μmol, 80 %) als hell-oranger, amorpher Feststoff isoliert werden, wobei die dargestellte phenolische Form dominierte (Indikativ: ¹³C-Signal von C-3'' – δ_C 165.2 ppm).¹³¹ *Aufgrund der NMR-spektroskopischen Eigenschaften des*

¹⁷⁰ Verdünnte Bedingungen; A. W. Schwabacher, J. W. Lane, M. W. Schiesher, K. M. Leigh, C. W. Johnson, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 1727-1729.

¹⁷¹ Y. Lu, J. Gervay-Hague, *Carbohydr. Res.* **2007**, *342*, 1636-1650.

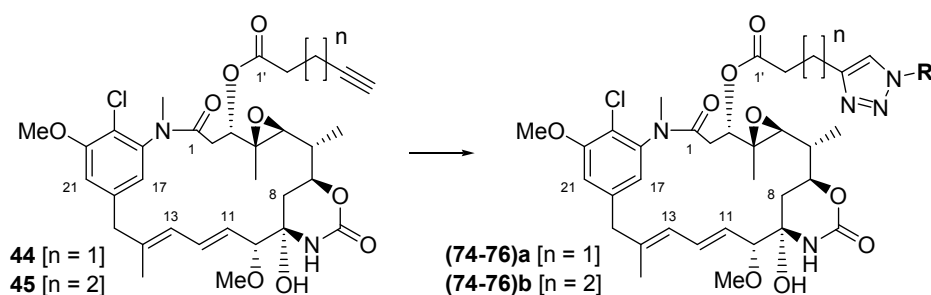
fluorophoren Systems (Signalverbreiterung, vgl. Spektrenanhang) konnte den quartären Kohlenstoffen C-5'', C-2' und C-4' keine Signale zugeordnet werden.

Tabelle: Chromatographische Reinigung des Fluorescein-Linker-Konstrukts **83**.

PROBE	SYSTEM (KAP. 6.1)	ELUTIONSBEDINGUNGEN	FRAKTIONEN
Rohprodukt	C18-SP	H ₂ O:MeOH [A:B], Flussrate = 2.25 mL/min Gradient (t [min]/B [%]): (0/20) (5/20) (30/60)	83 *2NH ₍₁₋₂₎ R (t _R = 27.0 min)
83 *2NH ₍₁₋₂₎ R	CN-SP	H ₂ O+0.1% TFA:MeOH [A:B], Flussrate = 2.25 mL/min Gradient (t [min]/B [%]): (0/10) (5/10) (90/80)	83 (t _R = 63.0 min)

¹H-NMR (400 MHz, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 8.28 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, 3'-H), 7.89 (dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz, 1H, 5'-H), 7.24 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, 6'-H), 7.00 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, 1''-H), 6.90 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H, 4''-H), 6.76 (dd, *J* = 8.9, 2.4 Hz, 2H, 2''-H), 3.83 (bs, 2H, 6-H), 3.74 (bt, *J* = 5.1 Hz, 2H, 5-H), 3.70 (s, 4H, 3-H & 4-H), 3.67 (bt, *J* = 5.0 Hz, 2H, 2-H), 3.37 (bt, *J* = 5.0 Hz, 2H, 1-H) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.00 ppm): δ 183.0 (s, C-7), 170.1 (s, 2'-COO), 165.2 (s, C-3''), 156.5 (s, C-6''), 143.0 (s, C-1'), 131.7 (d, C-1''), 130.5 (d, C-5'), 127.6 (d, C-6'), 122.1 (d, C-3'), 116.1 (d, C-2''), 113.9 (s, C-7''), 103.4 (d, C-4''), 71.5 (t, C-3 & C-4), 71.4 (t, C-5), 71.1 (t, C-2), 51.7 (t, C-1), 45.5 (t, C-6) ppm; **UPLC-MS** [MeOH] t_R = 2.09 min; **HRMS** [ESI] *m/z* für C₂₇H₂₆N₅O₇S [M+H]⁺: ber. 564.1553, gef. 564.1559.

Generelle Vorschrift zur Synthese der Ansamitocin-Derivate **74-76(a/b)**



500 µL einer Ansamitocin-Derivat-Stammlösung (**44** oder **45**) [4 mM in MeOH] (1.3 mg, 2 µmol, 1-3 Äq.) werden mit einem Azidobaustein [gelöst in MeOH] (0.67-2.4 µmol, 1-1.2 Äq.) versetzt.

Variante A: Die Reaktionsmischung wird auf 1.5 mL mit MeOH verdünnt und mit DIPEA (6 µL, 35 µmol, 2.5 Äq._{(Cu(I)Br)}) versetzt. Die Lösung wird durch Einleitung von Argon über

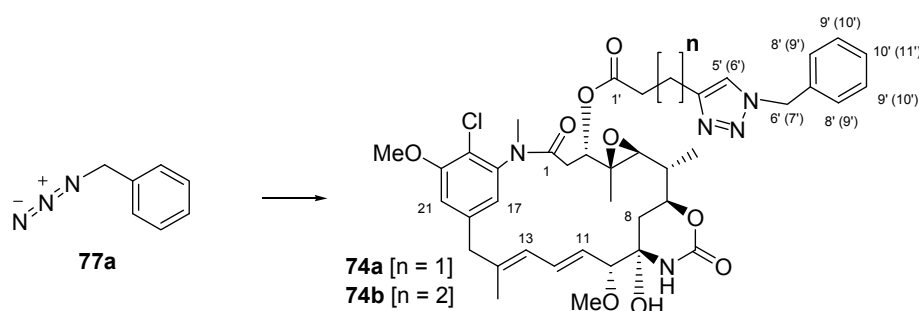
eine Kanüle 20 Minuten entgast und mit einer Spatelspitze Cu(I)Br (2 mg, 14 μmol , 7 Äq.) versetzt.

Variante B: Die Reaktionsmischung wird durch Einleitung von Argon über eine Kanüle 20 Minuten entgast und mit 200 μL einer zuvor erstellten Cu(I)Br-Suspension (2.7 μmol , 1.3 Äq.) versetzt. Erstellung der Cu(I)Br-Suspension: DIPEA (20 μL , 200 μmol , 5 Äq._{(Cu(I)Br)}) wird in MeOH (3 mL) gelöst und 20 Minuten durch Argoneinleitung entgast, mit Cu(I)Br (5.7 mg, 40 μmol) versetzt und für weitere 40 Minuten unter Lichtausschluß und Argonatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt, wobei sich eine gelbliche Suspension ausbildet.

Die Reaktionsmischung wird unter Lichtausschluß und Argonatmosphäre 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt (Kontrolle per UPLC-MS). Die Reaktionsmischung wird mit EDTA-Lösung [pH 8.0, 0.5 M] (1 mL, 500 μmol , >35 Äq._{(Cu(I)Br)}) versetzt und nach 3-5 Minuten direkt einer chromatographischen Reinigung durch *reversed phase*-HPLC unterzogen.

3-O-[3-(1-Benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)propionyl]maytansinol **74a**

3-O-[4-(1-Benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)butyryl]maytansinol **74b**



Ansamitocin-Derivat **44** bzw. **45** (1.3 mg, 2 μmol , 1.0 Äq.) wurde entsprechend der generellen Prozedur (Variante B) mit Benzylazid **77a** (320 μg [120 μL einer 20 mM-Stammlösung in MeOH], 2.4 μmol , 1.2 Äq.) umgesetzt. Nach chromatographischer Reinigung (*vide infra*) wurde Substanz **74a** (1.2 mg, 1.5 μmol , 75 %) bzw. **74b** (1.4 mg, 1.8 μmol , 90 %) als farbloser Feststoff erhalten.

Tabelle: Chromatographische Reinigung der Ansamitocin-Derivate **74a/b**.

PROBE	SYSTEM (KAP. 6.1)	ELUTIONSBEDINGUNGEN	FRAKTIONEN
Edukt 44: <i>vide supra</i>	C18-SP	H ₂ O:MeCN [A:B], Flussrate = 2.5 mL/min Gradient (t [min]/B [%]): (0/5) (5/5) (105/80)	74a (t_R = 75.5 min)
Edukt 45: <i>vide supra</i>	C18-SP	H ₂ O:MeCN [A:B], Flussrate = 2.5 mL/min Gradient (t [min]/B [%]): (0/5) (5/5) (105/70)	74b: F-1 (t_R = 81.0-84.0 min)

74b: F-1	CN-SP	H ₂ O:MeCN [A:B], Flussrate = 2.5 mL/min Gradient (t [min]/B [%]): (0/5) (5/5) (105/55)	74b (t _R = 78.0 min)
----------	-------	--	---------------------------------

3-*O*-[3-(1-Benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)propionyl]maytansinol **74a**:

¹H-NMR (400 MHz, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 7.78 (s, 1H, 5'-H), 7.39-7.30 (m, 5H, 6'-C₆H₅), 7.13 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, 21-H), 6.85 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, 17-H), 6.60 (dd, *J* = 15.4, 11.1 Hz, 1H, 12-H), 6.21 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H, 13-H), 5.59 (s, 2H, 6'-H), 5.45 (dd, *J* = 15.4, 9.0 Hz, 1H, 11-H), 4.77 (dd, *J* = 12.0, 2.9 Hz, 1H, 3-H), 4.18 (ddd, *J* = 10.6, 10.5, 3.7 Hz, 1H, 7-H), 3.98 (s, 3H, 20-OMe), 3.57 (d, *J* = 12.1 Hz, 1H, 15-H_a), 3.56 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, 10-H), 3.32 (s, 3H, 10-OMe), 3.28 (d, *J* = 12.1 Hz, 1H, 15-H_b), 3.05-3.00 (m, 2H, 3'-H), 3.03 (s, 3H, *N*-Me), 2.97-2.85 (m, 2H, 2'-H), 2.74 (d, *J* = 9.8 Hz, 1H, 5-H), 2.54 (dd, *J* = 13.8, 12.0 Hz, 1H, 2-H_a), 2.11 (dd, *J* = 13.8, 2.9 Hz, 1H, 2-H_b), 1.70 (s, 3H, 14-Me), 1.60-1.48 (m, 1H, 6-H), 1.57 (dd, *J* = 13.6, 3.7 Hz, 1H, 8-H_a), 1.52 (dd, *J* = 13.6, 10.6 Hz, 1H, 8-H_b), 1.22 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, 6-Me), 0.87 (s, 3H, 4-Me) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.00 ppm): δ 172.8 (s, C-1'), 171.3 (s, C-1), 157.4 (s, C-20), 155.3 (s, 7-CONH), 147.9 (s, C-4'), 143.0 (s, C-18), 142.8 (s, C-16), 141.2 (s, C-14), 136.9 (s, C-7'), 133.8 (d, C-12), 130.0 (d, 2 * C-9'), 129.8 (d, C-11), 129.5 (d, C-10'), 129.0 (d, 2 * C-8'), 125.9 (d, C-13), 123.9 (d, C-5'), 123.3 (d, C-17), 121.0 (s, C-19), 115.0 (d, C-21), 89.6 (d, C-10), 81.9 (s, C-9), 78.2 (d, C-3), 75.9 (d, C-7), 67.9 (d, C-5), 61.8 (s, C-4), 57.2 (q, 20-OMe), 57.0 (q, 10-OMe), 54.9 (t, C-6'), 47.4 (t, C-15), 39.1 (d, C-6), 37.5 (t, C-8), 36.1 (q, *N*-Me), 34.3 (t, C-2'), 33.8 (t, C-2), 21.4 (t, C-3'), 15.8 (q, 14-Me), 14.7 (q, 6-Me), 12.4 (q, 4-Me) ppm; **UPLC-MS** [MeOH] t_R = 2.47 min; **HRMS** [ESI] *m/z* für C₄₀H₄₉ClN₅O₉ [M+H]⁺: ber. 778.3219, gef. 778.3213.

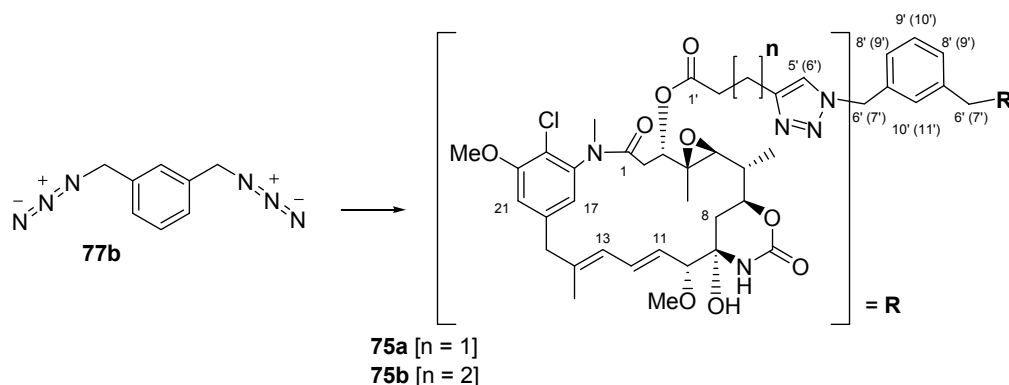
3-*O*-[4-(1-Benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)butyryl]maytansinol **74b**:

¹H-NMR (400 MHz, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 7.80 (s, 1H, 6'-H), 7.29 (s, 5H, 7'-C₆H₅), 7.13 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, 21-H), 6.74 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, 17-H), 6.57 (dd, *J* = 15.6, 10.8 Hz, 1H, 12-H), 6.10 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H, 13-H), 5.56 (d, *J* = 15.0 Hz, 1H, 7'-H_a), 5.52 (d, *J* = 15.0 Hz, 1H, 7'-H_b), 5.40 (dd, *J* = 15.6, 8.9 Hz, 1H, 11-H), 4.75 (dd, *J* = 11.9, 3.1 Hz, 1H, 3-H), 4.17 (ddd, *J* = 11.1, 10.6, 3.3 Hz, 1H, 7-H), 3.99 (s, 3H, 20-OMe), 3.55 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, 10-H), 3.51 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H, 15-H_a), 3.37 (s, 3H, 10-OMe), 3.25 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H, 15-H_b), 3.01 (s, 3H, *N*-Me), 2.79 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, 4'-H), 2.75 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H, 5-H), 2.60-2.55 (m, 2H, 2'-H), 2.54 (dd, *J* = 13.8, 11.9 Hz, 1H, 2-H_a), 2.10 (dd, *J* = 13.8, 3.1 Hz, 1H, 2-H_b), 2.05-1.96 (m, 2H, 3'-H), 1.69 (s, 3H, 14-Me), 1.59-1.46 (m, 1H, 6-H), 1.55 (dd, *J* = 13.8,

3.3 Hz, 1H, 8-H_a), 1.49 (dd, $J = 13.8, 11.1$ Hz, 1H, 8-H_b), 1.22 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, 6-Me), 0.84 (s, 3H, 4-Me) ppm; ¹³C-NMR (100 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.00 ppm): δ 173.5 (s, C-1'), 171.4 (s, C-1), 157.5 (s, C-20), 155.3 (s, 7-CONH), 148.9 (s, C-5'), 142.9 (s, C-18), 142.8 (s, C-16), 141.0 (s, C-14), 136.8 (s, C-8'), 133.8 (d, C-12), 130.0 (d, 2 * C-10'), 129.7 (d, C-11), 129.5 (d, C-11'), 129.2 (d, 2 * C-9'), 126.0 (d, C-13), 123.5 (d, C-6'), 123.2 (d, C-17), 119.7 (s, C-19), 114.9 (d, C-21), 89.7 (d, C-10), 81.9 (s, C-9), 78.1 (d, C-3), 75.9 (d, C-7), 67.9 (d, C-5), 61.8 (s, C-4), 57.2 (q, 20-OMe), 57.1 (q, 10-OMe), 54.9 (t, C-7'), 47.4 (t, C-15), 39.2 (d, C-6), 37.6 (t, C-8), 36.1 (q, N-Me), 34.4 (t, C-2'), 33.7 (t, C-2), 25.7 (t, C-3'), 25.5 (t, C-4'), 15.8 (q, 14-Me), 14.7 (q, 6-Me), 12.4 (q, 4-Me) ppm; UPLC-MS [MeOH] $t_R = 2.43$ min; HRMS [ESI] m/z für C₄₁H₅₁ClN₅O₉ [M+H]⁺: ber. 792.3375, gef. 792.3357.

1,3-Bis{[4-(3-*O*-propionyl-maytansinol-3'-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]methyl}benzen 75a

1,3-Bis{[4-(3-*O*-butyryl-maytansinol-3'-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]methyl}benzen 75b



Ansamitocin-Derivat **44** bzw. **45** (1.3 mg, 2 μ mol, 2.0 Äq.) wurde entsprechend der generellen Prozedur (**75a**: Variante B, **75b**: Variante A) mit Benzylazid **77b** (188 μ g [100 μ L einer 10 mM-Stammlösung in MeOH], 1 μ mol, 1.0 Äq.) umgesetzt. Nach chromatographischer Reinigung (*vide infra*) wurde Dimer **75a** (1.1 mg, 0.74 μ mol, 74 %) bzw. **75b** (1.5 mg, 1.0 μ mol, quant.) als farbloser Feststoff erhalten.

Tabelle: Chromatographische Reinigung der Ansamitocin-Derivate **75a/b**.

PROBE	SYSTEM (KAP. 6.1)	ELUTIONSBEDINGUNGEN	FRAKTIONEN
Edukt 44: <i>vide supra</i>	C18-SP	H ₂ O:MeCN [A:B], Flussrate = 2.5 mL/min Gradient (t [min]/B [%]): (0/5) (5/5) (105/55) (105.1/100) (120/100)	75a ($t_R = 110.1$ min)
Edukt 45: <i>vide supra</i>	C18-SP	H ₂ O:MeCN [A:B], Flussrate = 2.5 mL/min Gradient (t [min]/B [%]): (0/20) (5/20) (55/100)	75b ($t_R = 39.1$ min)

1,3-Bis{[4-(3-*O*-propionyl-maytansinol-3'-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]methyl}benzen **75a**:

¹H-NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 7.80 (s, 2H, 2 * 5'-H), 7.38 (dd, *J* = 7.5, 7.5 Hz, 1H, 9'-H), 7.30 (dd, *J* = 7.5, 1.7 Hz, 2H, 2 * 8'-H), 7.26 (dd, *J* = 1.7, 1.7 Hz, 1H, 10'-H), 7.13 (d, *J* = 1.8 Hz, 2H, 2 * 21-H), 6.87 (d, *J* = 1.8 Hz, 2H, 2 * 17-H), 6.61 (dd, *J* = 15.4, 11.1 Hz, 2H, 2 * 12-H), 6.26 (d, *J* = 11.1 Hz, 2H, 2 * 13-H), 5.60 (s, 4H, 2 * 6'-H), 5.49 (dd, *J* = 15.4, 8.8 Hz, 2H, 2 * 11-H), 4.78 (dd, *J* = 12.0, 2.8 Hz, 2H, 2 * 3-H), 4.19 (ddd, *J* = 11.1, 10.8, 3.3 Hz, 2H, 2 * 7-H), 3.97 (s, 6H, 2 * 20-OMe), 3.59 (d, *J* = 12.3 Hz, 2H, 2 * 15-H_a), 3.57 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, 2 * 10-H), 3.32 (s, 6H, 2 * 10-OMe), 3.28 (d, *J* = 12.3 Hz, 2H, 2 * 15-H_b), 3.07-3.00 (m, 4H, 2 * 3'-H), 2.98-2.93 (m, 4H, 2 * 2'-H), 2.97 (s, 6H, 2 * *N*-Me), 2.73 (d, *J* = 9.8 Hz, 2H, 2 * 5-H), 2.54 (dd, *J* = 13.9, 12.0 Hz, 2H, 2 * 2-H_a), 2.11 (dd, *J* = 13.9, 2.8 Hz, 2H, 2 * 2-H_b), 1.71 (s, 6H, 2 * 14-Me), 1.59-1.49 (m, 2H, 2 * 6-H), 1.58 (dd, *J* = 13.9, 3.3 Hz, 2H, 2 * 8-H_a), 1.53 (dd, *J* = 13.9, 11.1 Hz, 2H, 2 * 8-H_b), 1.22 (d, *J* = 6.3 Hz, 6H, 2 * 6-Me), 0.87 (s, 6H, 2 * 4-Me) ppm; **¹³C-NMR** (125 MHz, Methanol-*d*₄, Methanol-*d*₄ = 49.00 ppm): δ 172.8 (s, 2 * C-1'), 171.2 (s, 2 * C-1), 157.4 (s, 2 * C-20), 155.3 (s, 2 * 7-CONH), 147.9 (s, 2 * C-4'), 143.0 (s, 2 * C-18), 142.8 (s, 2 * C-16), 141.2 (s, 2 * C-14), 137.9 (s, 2 * C-7'), 133.9 (d, 2 * C-12), 130.7 (d, C-9'), 129.9 (d, 2 * C-11), 129.1 (d, 2 * C-8'), 128.4 (d, C-10'), 125.9 (d, 2 * C-13), 124.1 (d, 2 * C-5'), 123.3 (d, 2 * C-17), 119.6 (s, 2 * C-19), 114.9 (d, 2 * C-21), 89.6 (d, 2 * C-10), 81.9 (s, 2 * C-9), 78.1 (d, 2 * C-3), 75.9 (d, 2 * C-7), 67.8 (d, 2 * C-5), 61.9 (s, 2 * C-4), 57.1 (q, 2 * 20-OMe), 57.0 (q, 2 * 10-OMe), 54.5 (t, 2 * C-6'), 47.4 (t, 2 * C-15), 39.1 (d, 2 * C-6), 37.5 (t, 2 * C-8), 36.1 (q, 2 * *N*-Me), 34.2 (t, 2 * C-2'), 33.8 (t, 2 * C-2), 21.4 (t, 2 * C-3'), 15.8 (q, 2 * 14-Me), 14.7 (q, 2 * 6-Me), 12.3 (q, 4-Me) ppm; **UPLC-MS** [MeOH] *t*_R = 2.70 min; **HRMS** [ESI] *m/z* für C₇₄H₉₁Cl₂N₁₀O₁₈ [M+H]⁺: ber. 1477.5890, gef. 1477.5892.

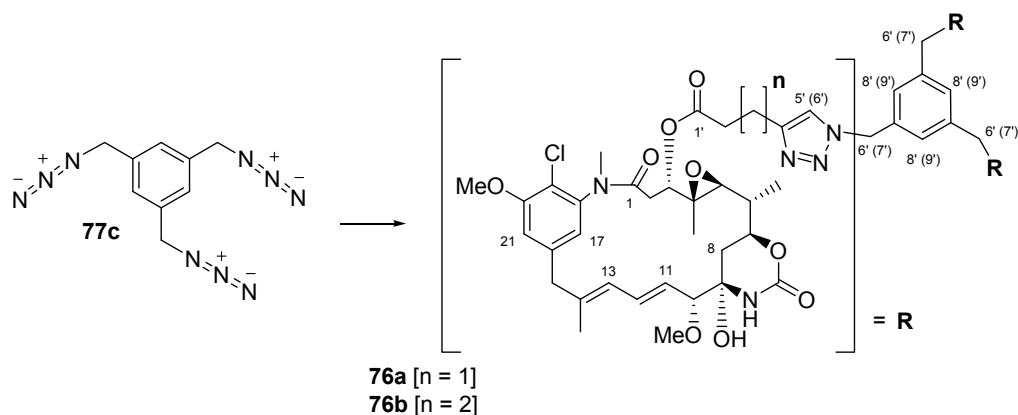
1,3-Bis{[4-(3-*O*-butyryl-maytansinol-3'-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]methyl}benzen **75b**:

¹H-NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 7.81 (s, 2H, 2 * 6'-H), 7.28 (bs, 1H, 2 * 11'-H), 7.25 (ps d, *J* = 1.3 Hz, 3H, 2 * 9'-H & 10'-H), 7.13 (d, *J* = 1.8 Hz, 2H, 2 * 21-H), 6.78 (d, *J* = 1.8 Hz, 2H, 2 * 17-H), 6.58 (dd, *J* = 15.4, 11.1 Hz, 2H, 2 * 12-H), 6.11 (d, *J* = 11.1 Hz, 2H, 2 * 13-H), 5.53 (s, 4H, 2 * 7'-H), 5.39 (dd, *J* = 15.4, 9.0 Hz, 2H, 2 * 11-H), 4.76 (dd, *J* = 12.0, 2.9 Hz, 2H, 2 * 3-H), 4.18 (ddd, *J* = 10.8, 10.7, 3.4 Hz, 2H, 2 * 7-H), 3.98 (s, 6H, 2 * 20-OMe), 3.55 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, 2 * 10-H), 3.51 (d, *J* = 12.7 Hz, 2H, 2 * 15-H_a), 3.36 (s, 6H, 2 * 10-OMe), 3.23 (d, *J* = 12.7 Hz, 2H, 2 * 15-H_b), 3.03 (s, 6H, 2 * *N*-Me), 2.79 (t, *J* = 7.4 Hz, 4H, 2 * 4'-H), 2.74 (d, *J* = 9.7 Hz, 2H, 2 * 5-H), 2.59 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, 2 * 2'-H_a), 2.59 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, 2 * 2'-H_b), 2.54 (dd, *J* = 13.9, 12.0 Hz, 2H, 2 * 2-H_a), 2.10 (dd,

$J = 13.9, 2.9$ Hz, 2H, 2 * 2- H_b), 2.05-1.98 (m, 4H, 2 * 3'-H), 1.69 (s, 6H, 2 * 14-Me), 1.58-1.47 (m, 2H, 2 * 6-H), 1.54 (dd, $J = 13.8, 3.4$ Hz, 2H, 2 * 8- H_a), 1.50 (dd, $J = 13.8, 10.8$ Hz, 2H, 2 * 8- H_b), 1.21 (d, $J = 6.4$ Hz, 6H, 2 * 6-Me), 0.85 (s, 6H, 2 * 4-Me) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, Methanol- d_4 , Methanol- $d_4 = 49.00$ ppm): δ 173.5 (s, 2 * C-1'), 171.4 (s, 2 * C-1), 157.4 (s, 2 * C-20), 155.3 (s, 2 * 7-CONH), 148.9 (s, 2 * C-5'), 142.9 (s, 2 * C-18), 142.8 (s, 2 * C-16), 141.1 (s, 2 * C-14), 137.8 (s, 2 * C-8'), 133.8 (d, 2 * C-12), 130.7 (d, C-10'), 129.8 (d, 2 * C-11), 129.3 (d, 2 * C-9'), 128.9 (d, 2 * C-11'), 126.0 (d, 2 * C-13), 123.6 (d, 2 * C-6'), 123.2 (d, 2 * C-17), 119.6 (s, 2 * C-19), 114.9 (d, 2 * C-21), 89.7 (d, 2 * C-10), 81.9 (s, 2 * C-9), 78.0 (d, 2 * C-3), 75.9 (d, 2 * C-7), 67.9 (d, 2 * C-5), 61.8 (s, 2 * C-4), 57.2 (q, 2 * 20-OMe), 57.1 (q, 2 * 10-OMe), 54.5 (t, 2 * C-7'), 47.4 (t, 2 * C-15), 39.2 (d, 2 * C-6), 37.5 (t, 2 * C-8), 36.1 (q, 2 * N-Me), 34.3 (t, 2 * C-2'), 33.7 (t, 2 * C-2), 25.7 (t, 2 * C-3'), 25.5 (t, 2 * C-4'), 15.8 (q, 2 * 14-Me), 14.7 (q, 2 * 6-Me), 12.4 (q, 2 * 4-Me) ppm; **UPLC-MS** [MeOH] $t_R = 2.56$ min; **HRMS** [ESI] m/z für $\text{C}_{76}\text{H}_{95}\text{Cl}_2\text{N}_{10}\text{O}_{18}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: ber. 1505.6203, gef. 1505.6167.

1,3,5-Tris{[4-(3-*O*-propionyl-maytansinol-3'-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]methyl}benzen 76a

1,3,5-Tris{[4-(3-*O*-butyryl-maytansinol-3'-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]methyl}benzen 76b



Ansamitocin-Derivat **44** bzw. **45** (1.3 mg, 2 μmol , 3.0 \AA q.) wurde entsprechend der generellen Prozedur (Variante B) mit Benzylazid **77c** (163 μg [100 μL einer 6.7 mM-Stammlösung in MeOH], 0.67 μmol , 1.0 \AA q.) umgesetzt. Nach chromatographischer Reinigung (*vide infra*) wurde Trimer **76a** (0.6 mg, 0.28 μmol , 42 %) bzw. **76b** (1.5 mg, 0.67 μmol , quant.) als farbloser Feststoff erhalten.

Tabelle: Chromatographische Reinigung der Ansamitocin-Derivate **76a/b**.

PROBE	SYSTEM (KAP. 6.1)	ELUTIONSBEDINGUNGEN	FRAKTIONEN
<i>vide supra</i>	C18-SP	H ₂ O:MeCN [A:B], Flussrate = 2.5 mL/min Gradient (t [min]/B [%]): (0/20) (5/20) (55/100)	Edukt 44: 76a (t _R = 42.2 min) bzw. Edukt 45: 76b (t _R = 42.0 min)

1,3,5-Tris{[4-(3-*O*-propionyl-maytansinol-3'-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]methyl}benzen **76a**:

¹H-NMR (500 MHz, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 7.81 (s, 3H, 3 * 5'-H), 7.22 (s, 3H, 3 * 8'-H), 7.12 (d, *J* = 1.8 Hz, 3H, 3 * 21-H), 6.90 (d, *J* = 1.8 Hz, 3H, 3 * 17-H), 6.62 (dd, *J* = 15.4, 11.1 Hz, 3H, 3 * 12-H), 6.30 (dq, *J* = 11.1, 1.1 Hz, 3H, 3 * 13-H), 5.60 (s, 6H, 3 * 6'-H), 5.52 (dd, *J* = 15.4, 8.9 Hz, 3H, 3 * 11-H), 4.79 (dd, *J* = 12.0, 2.8 Hz, 3H, 3 * 3-H), 4.21 (ddd, *J* = 11.1, 10.9, 2.8 Hz, 3H, 3 * 7-H), 3.97 (s, 9H, 3 * 20-OMe), 3.61 (d, *J* = 12.6 Hz, 3H, 3 * 15-H_a), 3.58 (d, *J* = 8.9 Hz, 3H, 3 * 10-H), 3.32 (s, 9H, 3 * 10-OMe), 3.27 (d, *J* = 12.6 Hz, 3H, 3 * 15-H_b), 3.11-2.97 (m, 6H, 3 * 3'-H), 3.03-2.93 (m, 6H, 3 * 2'-H), 2.90 (s, 9H, 3 * *N*-Me), 2.73 (d, *J* = 9.8 Hz, 3H, 3 * 5-H), 2.53 (dd, *J* = 13.9, 12.0 Hz, 3H, 3 * 2-H_a), 2.10 (dd, *J* = 13.9, 2.8 Hz, 3H, 3 * 2-H_b), 1.71 (s, 9H, 3 * 14-Me), 1.60-1.49 (m, 3H, 3 * 6-H), 1.59 (dd, *J* = 13.8, 2.8 Hz, 3H, 3 * 8-H_a), 1.54 (dd, *J* = 13.8, 11.1 Hz, 3H, 3 * 8-H_b), 1.22 (d, *J* = 6.4 Hz, 9H, 3 * 6-Me), 0.87 (s, 9H, 3 * 4-Me) ppm; **¹³C-NMR** (125 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.00 ppm): δ 172.8 (s, 3 * C-1'), 171.1 (s, 3 * C-1), 157.4 (s, 3 * C-20), 155.3 (s, 3 * 7-CONH), 147.9 (s, 3 * C-4'), 143.0 (s, 3 * C-18), 142.8 (s, 3 * C-16), 141.3 (s, 3 * C-14), 138.9 (s, 3 * C-7'), 133.9 (d, 3 * C-12), 129.9 (d, 3 * C-11), 128.3 (d, 3 * C-8'), 126.0 (d, 3 * C-13), 124.3 (d, 3 * C-5'), 123.3 (d, 3 * C-17), 119.6 (s, 3 * C-19), 114.9 (d, 3 * C-21), 89.6 (d, 3 * C-10), 82.0 (s, 3 * C-9), 78.1 (d, 3 * C-3), 75.9 (d, 3 * C-7), 67.8 (d, 3 * C-5), 61.9 (s, 3 * C-4), 57.2 (q, 3 * 20-OMe), 57.1 (q, 3 * 10-OMe), 54.1 (t, 3 * C-6'), 47.4 (t, 3 * C-15), 39.1 (d, 3 * C-6), 37.5 (t, 3 * C-8), 36.1 (q, 3 * *N*-Me), 34.2 (t, 3 * C-2'), 33.8 (t, 3 * C-2), 21.4 (t, 3 * C-3'), 15.8 (q, 3 * 14-Me), 14.7 (q, 3 * 6-Me), 12.4 (q, 3 * 4-Me) ppm; **UPLC-MS** [MeOH] t_R = 2.69 min; **HRMS** [ESI] *m/z* für C₁₀₈H₁₃₄Cl₃N₁₅O₂₇ [M+2H]²⁺: ber. 1088.9297, gef. 1088.9150.

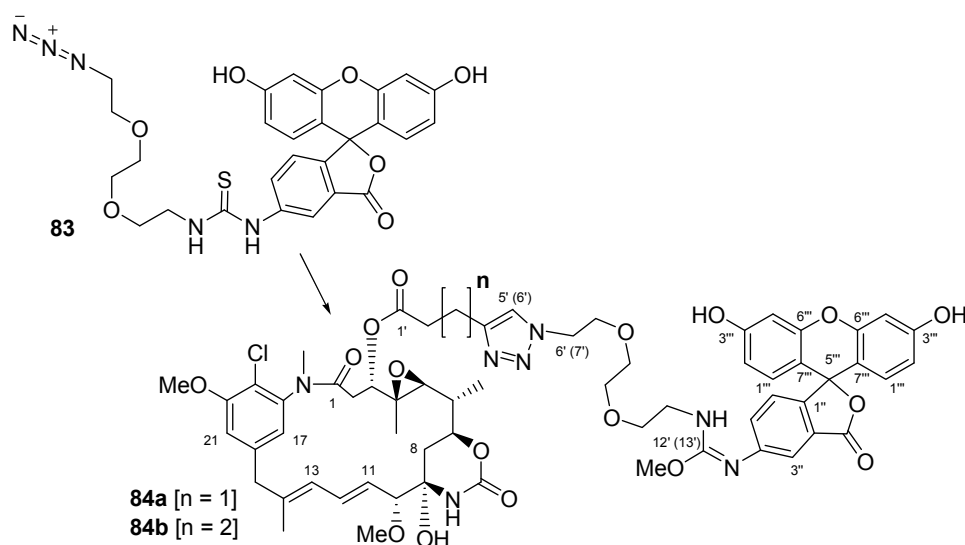
1,3,5-Tris{[4-(3-*O*-butyryl-maytansinol-3'-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]methyl}benzen **76b**:

¹H-NMR (500 MHz, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 7.80 (s, 3H, 3 * 6'-H), 7.22 (s, 3H, 3 * 9'-H), 7.13 (d, *J* = 1.9 Hz, 3H, 3 * 21-H), 6.82 (d, *J* = 1.9 Hz, 3H, 3 * 17-H), 6.59 (dd, *J* = 15.4, 11.1 Hz, 3H, 3 * 12-H), 6.13 (dq, *J* = 11.1, 1.1 Hz, 3H, 3 * 13-H), 5.50 (s, 6H, 3 * 7'-H), 5.39 (dd, *J* = 15.4, 8.9 Hz, 3H, 3 * 11-H), 4.76 (dd, *J* = 12.0, 2.9 Hz, 3H, 3 * 3-H), 4.19 (ddd, *J* = 11.1, 10.8, 3.4 Hz, 3H, 3 * 7-H), 3.98 (s, 9H, 3 * 20-OMe), 3.56 (d, *J* = 8.9 Hz, 3H,

3 * 10-H), 3.51 (d, $J = 12.7$ Hz, 3H, 3 * 15-H_a), 3.35 (s, 9H, 3 * 10-OMe), 3.23 (d, $J = 12.7$ Hz, 3H, 3 * 15-H_b), 3.05 (s, 9H, 3 * *N*-Me), 2.79 (t, $J = 7.4$ Hz, 6H, 3 * 4'-H), 2.74 (d, $J = 9.8$ Hz, 3H, 3 * 5-H), 2.62-2.57 (m, 6H, 3 * 2'-H), 2.54 (dd, $J = 13.9, 12.0$ Hz, 3H, 3 * 2-H_a), 2.11 (dd, $J = 13.9, 2.9$ Hz, 3H, 3 * 2-H_b), 2.05-1.98 (m, 6H, 3 * 3'-H), 1.70 (s, 9H, 3 * 14-Me), 1.59-1.46 (m, 3H, 3 * 6-H), 1.52 (dd, $J = 13.9, 3.4$ Hz, 3H, 3 * 8-H_a), 1.51 (dd, $J = 13.9, 11.1$ Hz, 3H, 3 * 8-H_b), 1.21 (d, $J = 6.4$ Hz, 9H, 3 * 6-Me), 0.85 (s, 9H, 3 * 4-Me) ppm; ¹³C-NMR (125 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.00 ppm): δ 173.5 (s, 3 * C-1'), 171.4 (s, 3 * C-1), 157.4 (s, 3 * C-20), 155.3 (s, 3 * 7-CONH), 149.0 (s, 3 * C-5'), 143.0 (s, 3 * C-18), 142.8 (s, 3 * C-16), 141.2 (s, 3 * C-14), 138.7 (s, 3 * C-8'), 133.9 (d, 3 * C-12), 129.8 (d, 3 * C-11), 128.7 (d, 3 * C-9'), 126.0 (d, 3 * C-13), 123.8 (d, 3 * C-6'), 123.2 (d, 3 * C-17), 119.7 (s, 3 * C-19), 114.9 (d, 3 * C-21), 89.7 (d, 3 * C-10), 81.9 (s, 3 * C-9), 78.0 (d, 3 * C-3), 75.9 (d, 3 * C-7), 67.9 (d, 3 * C-5), 61.8 (s, 3 * C-4), 57.2 (q, 3 * 20-OMe), 57.1 (q, 3 * 10-OMe), 54.2 (t, 3 * C-7'), 47.4 (t, 3 * C-15), 39.2 (d, 3 * C-6), 37.5 (t, 3 * C-8), 36.2 (q, 3 * *N*-Me), 34.3 (t, 3 * C-2'), 33.8 (t, 3 * C-2), 25.7 (t, 3 * C-3'), 25.6 (t, 3 * C-4'), 15.8 (q, 3 * 14-Me), 14.7 (q, 3 * 6-Me), 12.4 (q, 3 * 4-Me) ppm; UPLC-MS [MeOH] $t_R = 2.67$ min; HRMS [ESI] m/z für C₁₁₁H₁₄₀Cl₃N₁₅O₂₇ [M+2H]²⁺: ber. 1109.9554, gef. 1109.9440.

3-O-(3-{1-[2-(2-{2-[*N*-(fluorescein-5-yl)-*O*-methyl-isoure-*N'*-yl]ethoxy}ethoxy)ethyl]-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl}propionyl)maytansinol 84a

3-O-(4-{1-[2-(2-{2-[*N*-(fluorescein-5-yl)-*O*-methyl-isoure-*N'*-yl]ethoxy}ethoxy)ethyl]-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl}butyryl)maytansinol 84b



Ansamitocin-Derivat **44** bzw. **45** (1.3 mg, 2 μ mol, 1.0 Äq.) wurde entsprechend der generellen Prozedur (Variante B) mit Fluorescein-Linker-Konstrukt **83** (1.35 mg [gelöst in 0.5 mL MeOH], 2.4 μ mol, 1.2 Äq.) umgesetzt. Nach chromatographischer Reinigung (*vide*

infra) wurde Substanz **84a** (1.2 mg, 1 μ mol, 50 %) bzw. **84b** (1.8 mg, 1.5 μ mol, 75 %) als leuchtend gelber Feststoff erhalten. Aufgrund der NMR-spektroskopischen Eigenschaften des fluorophoren Systems (Signalverbreiterung, vgl. Spektrenanhang) konnte den quartären Kohlenstoffen C-5''', C-1'', C-2'', C-4'' und 2''-COO keine Signale zugeordnet werden. Dem Kohlenstoff des O-Methylisoharnstoffs (C-12'(13')) konnte kein durch HMBC-Kontakte verifizierbares Signal zugeordnet werden, wobei eine Überlagerung mit dem C-3'''-Signal (δ_C 161.8 ppm) wahrscheinlich ist (Lit.: δ_C 161.3 ppm, N-Benzoyl-O-methyl-N'-(p-bromphenyl)isoharnstoff).¹⁷² Durch partiellen Austausch erscheinen die Protonen des fluorophoren Systems mit geringerer Intensität (Integral ~0.7-0.8 statt 1.0).

Tabelle: Chromatographische Reinigung der Ansamitocin-Derivate **84a/b**.

PROBE	SYSTEM (KAP. 6.1)	ELUTIONSBEDINGUNGEN	FRAKTIONEN
<i>vide supra</i>	C18-SP	H ₂ O:MeOH [A:B], Flussrate = 2.25 mL/min Gradient (t [min]/B [%]): (0/20) (5/20) (40/100) (60/100)	Edukt 44 : 84a : F-1 (t_R = 30.0-36.0 min) bzw. Edukt 45 : 84b : F-1 (t_R = 29.0-36.0 min)
84a : F-1 bzw. 84b : F-1	C18-SP	0.1 % TFA in H ₂ O:MeOH [A:B], Flussrate = 2.25 mL/min Gradient (t [min]/B [%]): (0/10) (5/10) (55/55) (80/75) (85/100)	84a (t_R = 77.0 min) bzw. 84b (t_R = 77.0 min)

3-O-(3-{1-[2-(2-{2-[N-(fluorescein-5-yl)-O-methyl-isoure-N'-yl]ethoxy}ethoxy)ethyl]-1H-1,2,3-triazol-4-yl}propionyl)maytansinol **84a**:

¹H-NMR (500 MHz, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 7.78 (s, 1H, 5'-H), 7.76-7.68 (m, 1H, 6''-H), 7.43-7.36 (m, 1H, 3''-H/5''-H), 7.32-7.26 (m, 1H, 3''-H/5''-H), 7.10 (d, J = 1.9 Hz, 1H, 21-H), 6.85 (d, J = 1.9 Hz, 1H, 17-H), 6.71 (d, J = 2.3 Hz, 2H, 4'''-H), 6.71-6.61 (m, 2H, 1'''-H), 6.60 (dd, J = 15.4, 11.2 Hz, 1H, 12-H), 6.57 (dd, J = 8.8, 2.3 Hz, 2H, 2'''-H), 6.24 (d, J = 11.2 Hz, 1H, 13-H), 5.50 (dd, J = 15.4, 8.8 Hz, 1H, 11-H), 4.74 (dd, J = 12.0, 2.8 Hz, 1H, 3-H), 4.52 (t, J = 5.0 Hz, 2H, 6'-H), 4.36-4.20 (m, 3H, 12'-OMe), 4.18 (ddd, J = 10.3, 10.2, 4.3 Hz, 1H, 7-H), 3.97 (s, 3H, 20-OMe), 3.95-3.90 (m, 2H, 7'-H), 3.84-3.56 (m, 6H, 8'-H & 9'-H & 10'-H), 3.81-3.76 (m, 2H, 11'-H), 3.58 (d, J = 8.8 Hz, 1H, 10-H), 3.53 (d, J = 12.3 Hz, 1H, 15-H_a), 3.35 (s, 3H, 10-OMe), 3.22 (d, J = 12.3 Hz, 1H, 15-H_b), 3.06-2.95 (m, 2H, 3'-H), 3.01 (s, 3H, N-Me), 3.00-2.89 (m, 2H, 2'-H), 2.71 (d, J = 10.7 Hz, 1H, 5-H), 2.53 (dd, J = 14.1, 12.0 Hz, 1H, 2-H_a), 2.08 (dd, J = 14.1, 2.8 Hz, 1H, 2-H_b), 1.69 (s, 3H, 14-Me), 1.59-

¹⁷² J. Angulo Cornejo, F. Anaya Melendez, L. Beyer, R. Richter, J. Sieler, *Z. anorg. allg. Chem.* **1998**, 624, 892-896.

1.51 (m, 1H, 6-H), 1.57 (dd, $J = 13.6, 4.3$ Hz, 1H, 8-H_a), 1.53 (dd, $J = 13.6, 10.3$ Hz, 1H, 8-H_b), 1.20 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, 6-Me), 0.86 (s, 3H, 4-Me) ppm; ¹³C-NMR (125 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.00 ppm): δ 173.1 (s, C-1'), 171.2 (s, C-1), 161.8 (s, C-3'''), 157.4 (s, C-20), 155.3 (s, 7-CONH), 154.2 (s, C-6'''), 147.5 (s, C-4'), 142.9 (s, C-18), 142.8 (s, C-16), 141.2 (s, C-14), 133.9 (d, C-12), 133.8 (d, C-6''), 130.3 (d, C-11), 129.8 (d, C-1'''), 127.6 (d, C-3''/C-5''), 126.8 (d, C-3''/C-5''), 125.9 (d, C-13), 124.4 (d, C-5'), 123.3 (d, C-17), 119.6 (s, C-19), 114.9 (d, C-21), 113.9 (d, C-2'''), 111.0 (s, C-7'''), 103.6 (d, C-4'''), 89.6 (d, C-10), 81.9 (s, C-9), 78.2 (d, C-3), 75.9 (d, C-7), 71.6-71.3 (t, C-8' & C-9' & C-10'), 70.4 (t, C-7'), 67.9 (d, C-5), 61.8 (s, C-4), 59.9 (q, 12'-OMe), 57.1 (q, 20-OMe), 57.0 (q, 10-OMe), 51.3 (t, C-6'), 47.3 (t, C-15), 44.5 (t, C-11'), 39.1 (d, C-6), 37.4 (t, C-8), 36.1 (q, *N*-Me), 34.2 (t, C-2'), 33.7 (t, C-2), 21.4 (t, C-3'), 15.8 (q, 14-Me), 14.7 (q, 6-Me), 12.4 (q, 4-Me) ppm; UPLC-MS [MeOH] $t_R = 2.06$ min; HRMS [ESI] m/z für C₆₁H₆₉ClN₇O₁₇ [M+H]⁺: ber. 1206.4438, gef. 1206.4456; MSMS {1206.4 [M+H]⁺: 1188.4 [M-H₂O+H]⁺, 1144.4 [M-H₂O-CO₂+H]⁺, 660.2 [HOC^{1'}(O)R^{Seitenkette}+H]⁺, 547.2 [M-HOC^{1'}(O)R^{Seitenkette}+H]⁺, 485.2 [M-HOC^{1'}(O)R^{Seitenkette}-H₂O-CO₂+H]⁺.

3-*O*-(4-{1-[2-(2-{2-[*N*-(fluorescein-5-yl)-*O*-methyl-isoure-*N'*-yl]ethoxy}ethoxy)ethyl]-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl}butyryl)maytansinol **84b**:

¹H-NMR (500 MHz, Methanol-d₄, CHD₂OD = 3.31 ppm): δ 7.81 (s, 1H, 6'-H), 7.76-7.68 (m, 1H, 6''-H), 7.43-7.36 (m, 1H, 3''-H/5''-H), 7.32-7.22 (m, 1H, 3''-H/5''-H), 7.11 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, 21-H), 6.83 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, 17-H), 6.73-6.71 (m, 2H, 4'''-H), 6.70-6.62 (m, 2H, 1'''-H), 6.59 (dd, $J = 15.4, 11.0$ Hz, 1H, 12-H), 6.58-6.54 (m, 2H, 2'''-H), 6.17 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H, 13-H), 5.41 (dd, $J = 15.4, 8.9$ Hz, 1H, 11-H), 4.76 (dd, $J = 11.9, 2.8$ Hz, 1H, 3-H), 4.52 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H, 7'-H), 4.36-4.20 (m, 3H, 13'-OMe), 4.16 (ddd, $J = 10.9, 10.3, 4.0$ Hz, 1H, 7-H), 3.97 (s, 3H, 20-OMe), 3.93-3.87 (m, 2H, 8'-H), 3.80-3.57 (m, 6H, 9'-H & 10'-H & 11'-H), 3.79-3.72 (m, 2H, 12'-H), 3.55 (d, $J = 12.6$ Hz, 1H, 15-H_a), 3.55 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, 10-H), 3.35 (s, 3H, 10-OMe), 3.24 (d, $J = 12.6$ Hz, 1H, 15-H_b), 3.09 (s, 3H, *N*-Me), 2.78-2.70 (m, 2H, 4'-H), 2.72 (d, $J = 9.9$ Hz, 1H, 5-H), 2.65-2.51 (m, 2H, 2'-H), 2.56 (dd, $J = 14.0, 11.9$ Hz, 1H, 2-H_a), 2.11 (dd, $J = 14.0, 2.8$ Hz, 1H, 2-H_b), 2.01-1.92 (m, 2H, 3'-H), 1.69 (s, 3H, 14-Me), 1.58-1.50 (m, 1H, 6-H), 1.54 (dd, $J = 13.5, 4.0$ Hz, 1H, 8-H_a), 1.51 (dd, $J = 13.5, 10.9$ Hz, 1H, 8-H_b), 1.19 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, 6-Me), 0.85 (s, 3H, 4-Me) ppm; ¹³C-NMR (125 MHz, Methanol-d₄, Methanol-d₄ = 49.00 ppm): δ 173.7 (s, C-1'), 171.4 (s, C-1), 161.8 (s, C-3'''), 157.4 (s, C-20), 155.3 (s, 7-CONH), 154.1 (s, C-6'''), 148.4 (s, C-5'), 142.9 (s, C-18), 142.8 (s, C-16), 141.2 (s, C-14), 133.9 (d, C-12), 133.7 (d, C-6''), 130.3 (d, C-11), 129.7 (d, C-1'''),

127.5 (d, C-3"/C-5"), 126.7 (d, C-3"/C-5"), 125.9 (d, C-13), 124.0 (d, C-6'), 123.1 (d, C-17), 119.6 (s, C-19), 114.9 (d, C-21), 113.9 (d, C-2"), 110.7 (s, C-7"), 103.6 (d, C-4"), 89.6 (d, C-10), 81.9 (s, C-9), 78.1 (d, C-3), 75.9 (d, C-7), 71.6-71.3 (t, C-9' & C-10' & C-11'), 70.4 (t, C-8'), 67.9 (d, C-5), 61.8 (s, C-4), 59.9 (q, 13'-OMe), 57.2 (q, 20-OMe), 57.1 (q, 10-OMe), 51.4 (t, C-7'), 47.4 (t, C-15), 44.3 (t, C-12'), 39.2 (d, C-6), 37.5 (t, C-8), 36.2 (q, *N*-Me), 34.3 (t, C-2'), 33.8 (t, C-2), 25.8 (t, C-3'), 25.6 (t, C-4'), 15.8 (q, 14-Me), 14.7 (q, 6-Me), 12.4 (q, 4-Me) ppm; **UPLC-MS** [MeOH] t_R = 2.06 min; **HRMS** [ESI] m/z für $C_{62}H_{71}ClN_7O_{17}$ $[M+H]^+$: ber. 1220.4595, gef. 1220.4589; **MSMS** {1220.4 $[M+H]^+$ }: 1202.4 $[M-H_2O+H]^+$, 1158.5 $[M-H_2O-CO_2+H]^+$, 674.2 $[HOC^{1'}(O)R^{Seitenkette}+H]^+$, 547.2 $[M-HOC^{1'}(O)R^{Seitenkette}+H]^+$, 529.2 $[M-HOC^{1'}(O)R^{Seitenkette}-H_2O+H]^+$, 485.2 $[M-HOC^{1'}(O)R^{Seitenkette}-H_2O-CO_2+H]^+$.

6.12 Bioinformatikstudien aus Kapitel 4.2

Die Sequenzen der bakteriellen PKS-Dehydratasedomänen (PKS_DH; SM00826) wurden der SMART-Datenbank¹³⁸ entnommen und mittels ClustalW¹⁴⁷ unter Verwendung von Standardparametern aligniert. Zur Visualisierung wurde JalView¹⁷³ und zur Berechnung von Consensus-Sequenzen „Bork’s Alignment Tools“¹⁷⁴ verwendet. Zur Darstellung von alignierten Sequenzen wurde ESPrpt¹⁷⁵ verwendet. Die Erzeugung von Homologiemodellen erfolgte durch SWISS-MODEL¹⁴⁸, gefolgt von einer Visualisierung durch PyMOL.¹⁷⁶ Die in Kapitel 4.7 diskutierten Aminosäuresequenzen der *AsmB*-PKS-Module (Accession-Nummer AAM54076) sind an dieser Stelle unter Markierung der charakteristischen Motive aufgeführt:

>AAM54076 - KR3 - 1400-1584

VAGPAGLDPKTVVLTGGTGALGRLVARHLVTEHGARRLLLLGRGGPERARDLVAE
LTGLGAEVEALACDVADRGALSTALAGRALTAVVHLA**GD**GVVTALTPERLAAAF
APKALAAARHLDLTDQDLAAVLFSSVASVLGS**AG**QANYAAANGFLDGLAHERHAL
GLPATSIAWGLWDVD

> AAM54076 – DH3 - 997-1157

AGLVPSGHPLLGLVPLADGAVLTGRLSLSAQ**PWLAD**HRVLGAVVVPGLVALVELAV
RAGDEVGCPALEELVVAAPLVVPESGDVAVRVVVGPRGADGTRPVD**VL**SGD**Q**PPV
LHARGVLGPPEPVGQWPPAGAEPVDLAGLYPDFAAKGLEYGPHFQR

Die Ergebnisse der Alignierung von 856 PKS-Dehydratasedomänen sind als Vergleich der AsmDH3-Sequenz (jeweils obere Zeile) im Vergleich zu aus den Daten berechneten Consensus-Sequenzen dargestellt (jeweils mittlere Zeile: Consensus 80 %; jeweils untere Zeile : Consensus 50 %):

```

1 HPLGALVPLAD--GAVLTGRLSLSAQ-PWLADHRVLGAVVVPGLVALVELAVRAGDEVGCPALEELVVA 67
1 tshhtthht--t-----h--tt-saLs-Hh---h l hPusuh l-hsh tAut-hhh----- 38
1 HPLGusls lsssssh--hsuc loss scPWLADHsv tGsl l lPGsAa lELAlcAucpsusstlp-Lsltt 67

68 PLVVPESGDVA---VRVVVGPRGAD-GTRPVDVLSG-----DQPPVLHARGVLGPPEPVGQWPP 126
39 -----h-h t--lh-s-t----t-h thh-h----- 51
68 P l h l s-----ts l p l p s s v s s s c s s s s p + s l s l a u c p s s t t t - h s t p A s u h l s - t s ----- s s h P P 122

127 AGA3PVDLAGLYPDFAAKG--LEYGPHFQRL 155
52 -----h h t-h t--h tYGssaps l 66
123 ssups l s l s s h t p h Y s p h u p t G h s Y G P u F p G L 154

```

¹⁷³ A. M. Waterhouse, J. B. Procter, D. M. A. Martin, M. Clamp, G. J. Barton, *Bioinformatics* **2009**, 25, 1189-1191.

¹⁷⁴ <http://coot.embl.de/Alignment>

¹⁷⁵ P. Gouet, E. Courcelle, D. I. Stuart, F. Metoz, *Bioinformatics* **1999**, 15, 305-308.

¹⁷⁶ DELANO SCIENTIFIC, San Carlos, CA, USA 2002.

7 Anhang

7.1 Quantifizierung durch analytische HPLC

Die unter 6.7 und 6.8 beschriebenen Quantifizierungen durch analytische *reversed phase*-HPLC basieren auf den abgebildeten Kalibriergeraden eines Ansamitocin P-3 **1c**-Standards (Abbildung 22).³⁶

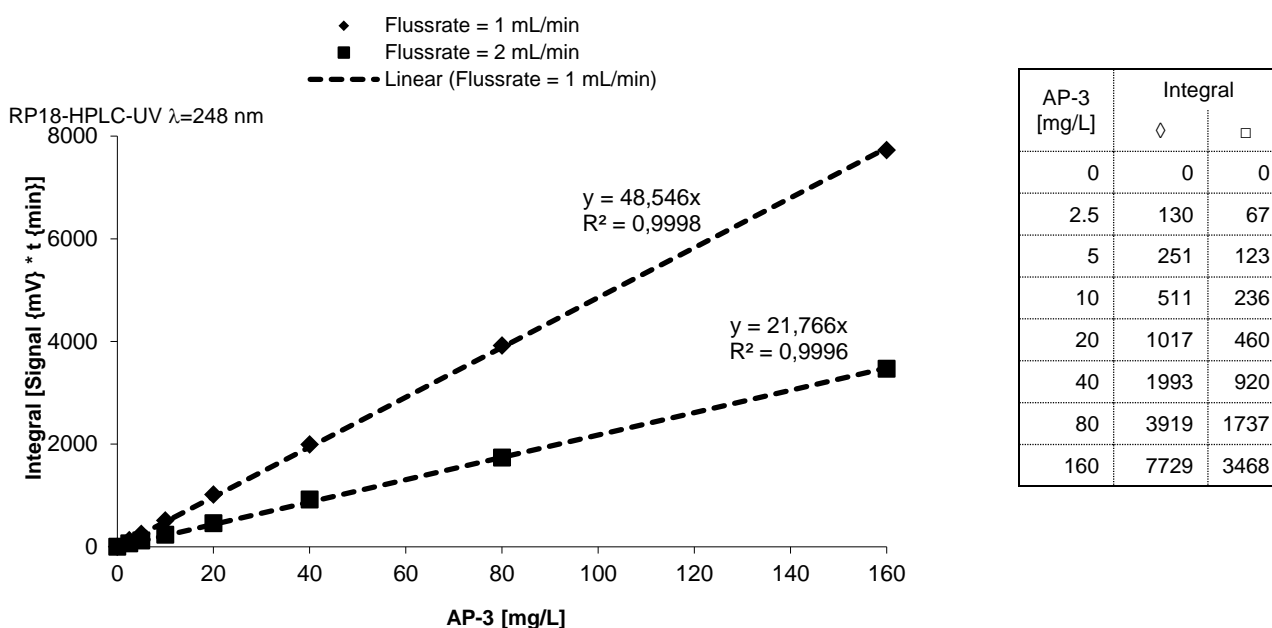
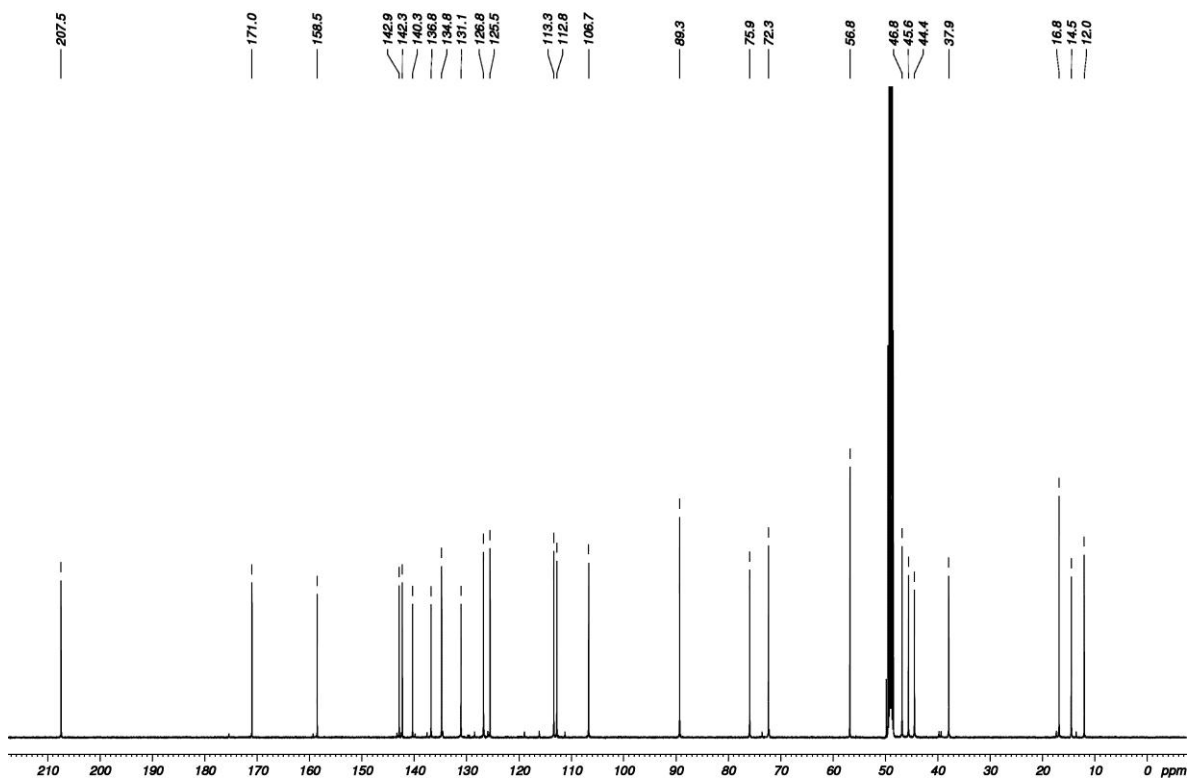
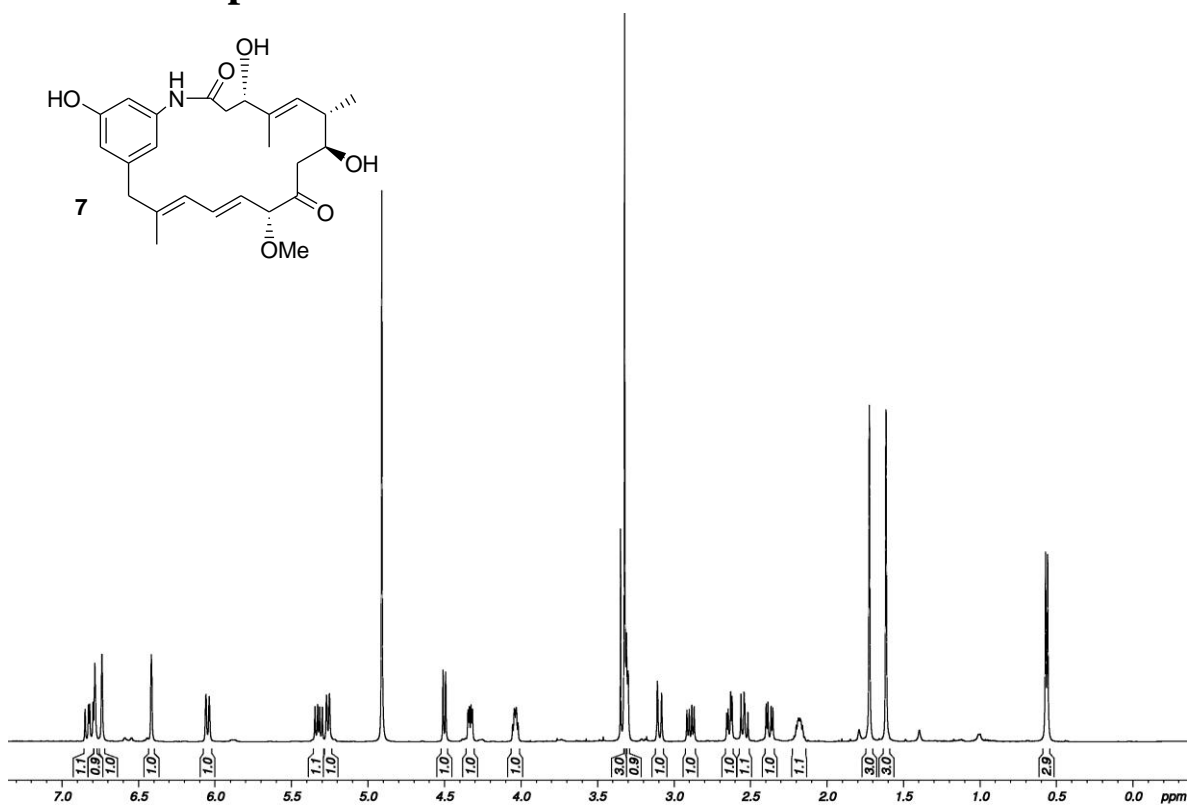
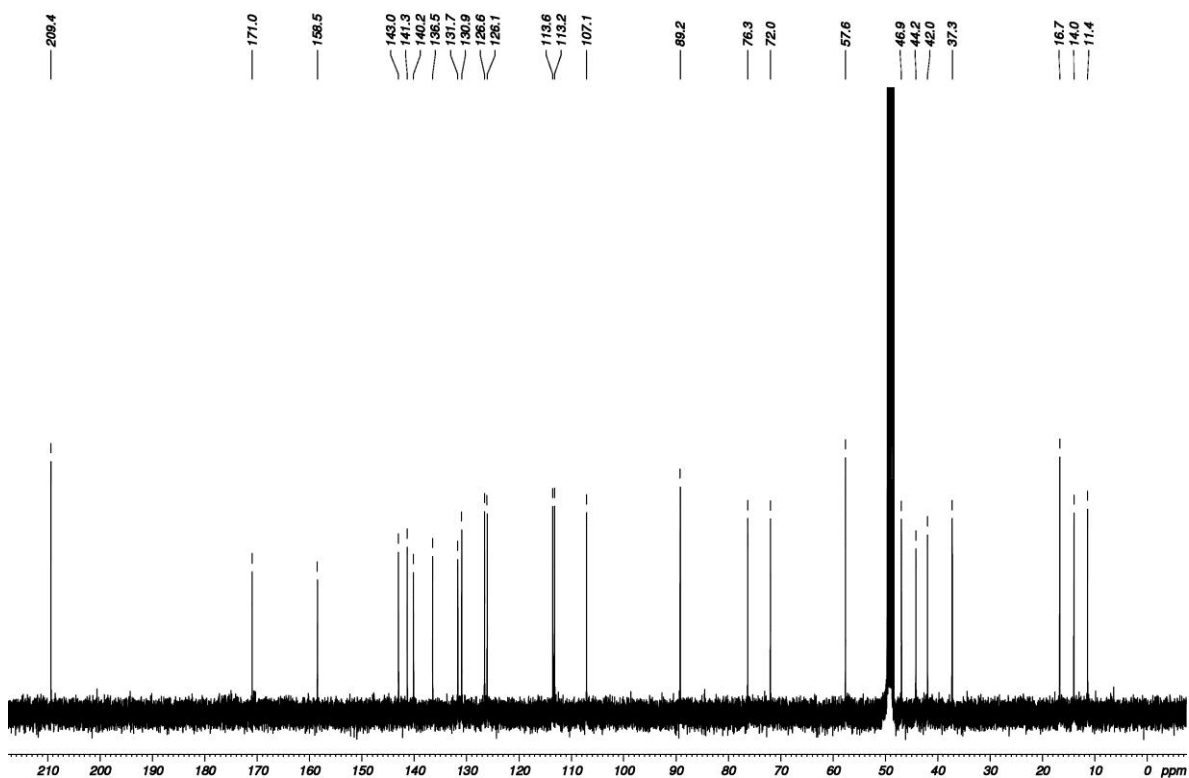
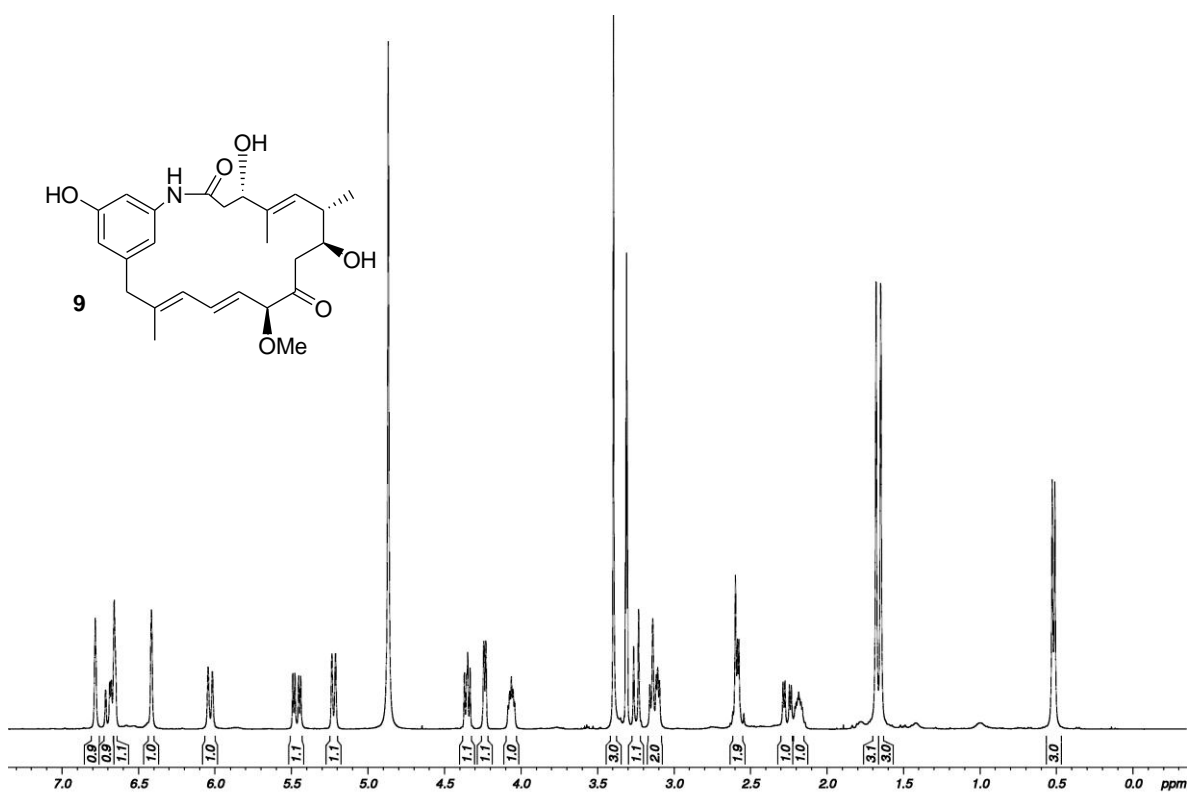
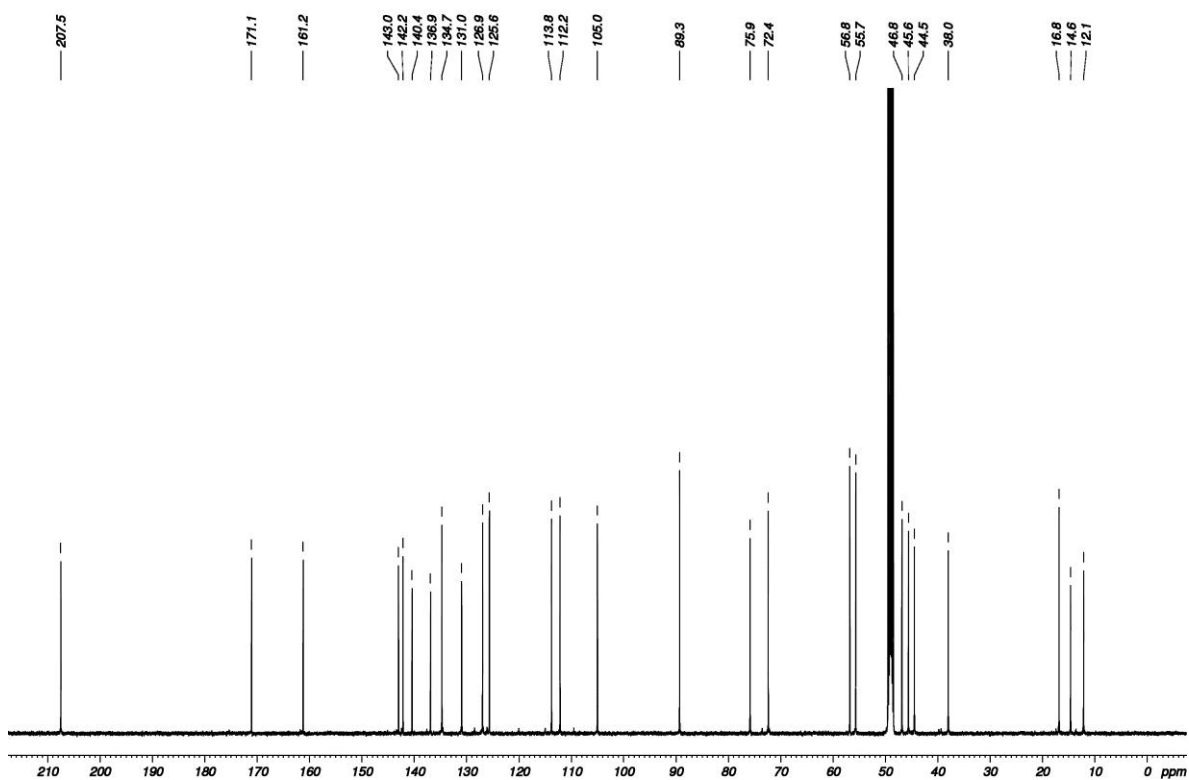
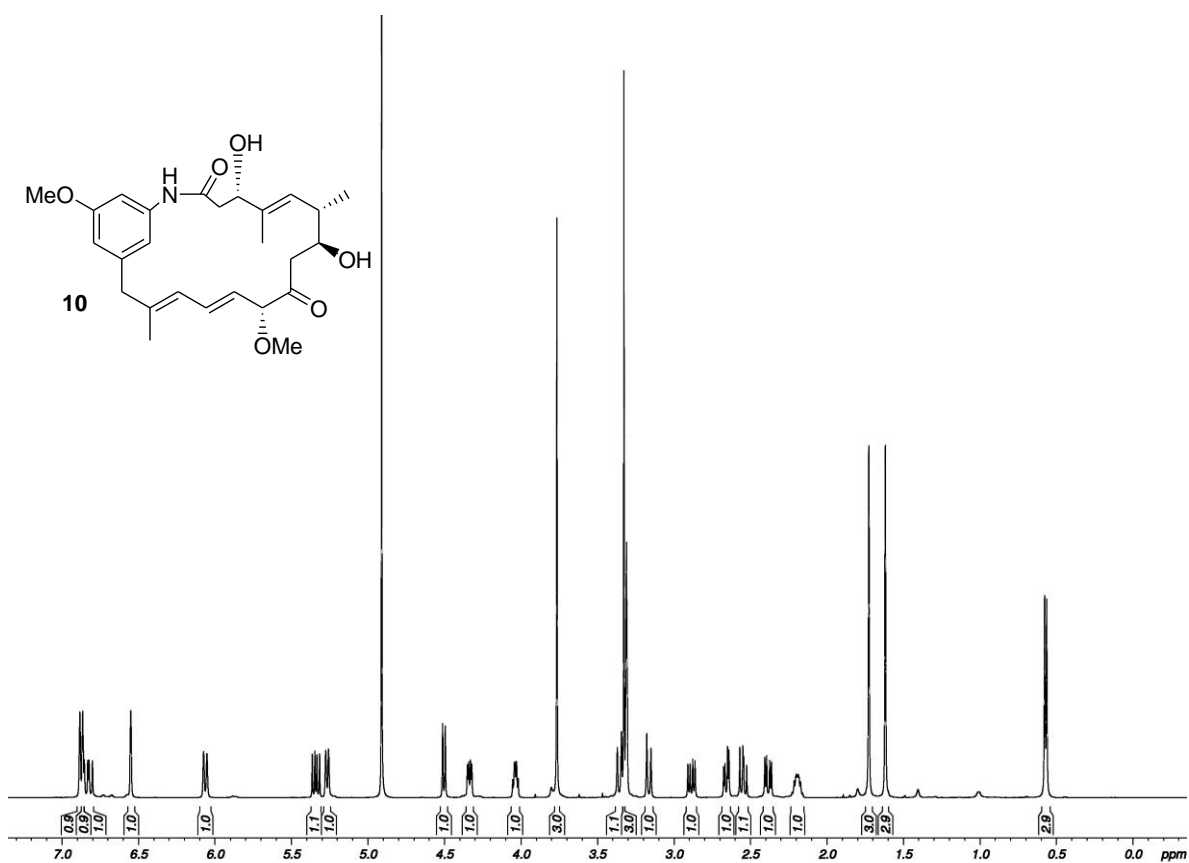


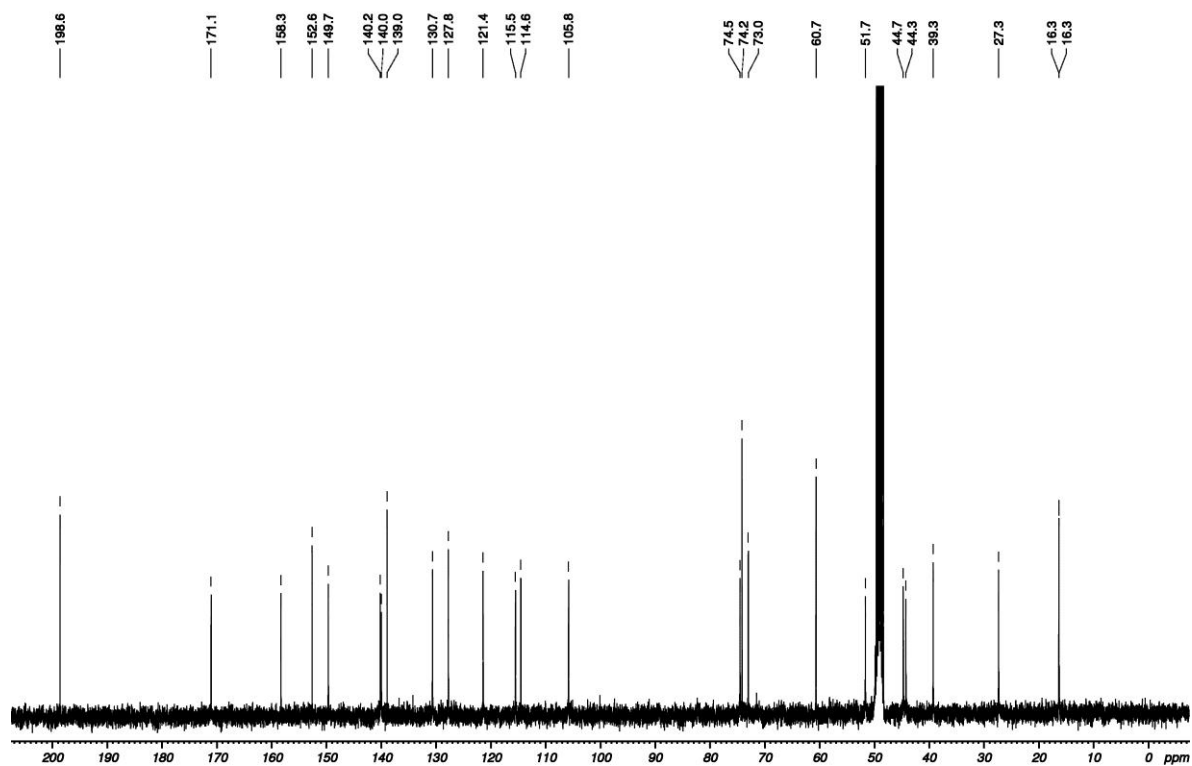
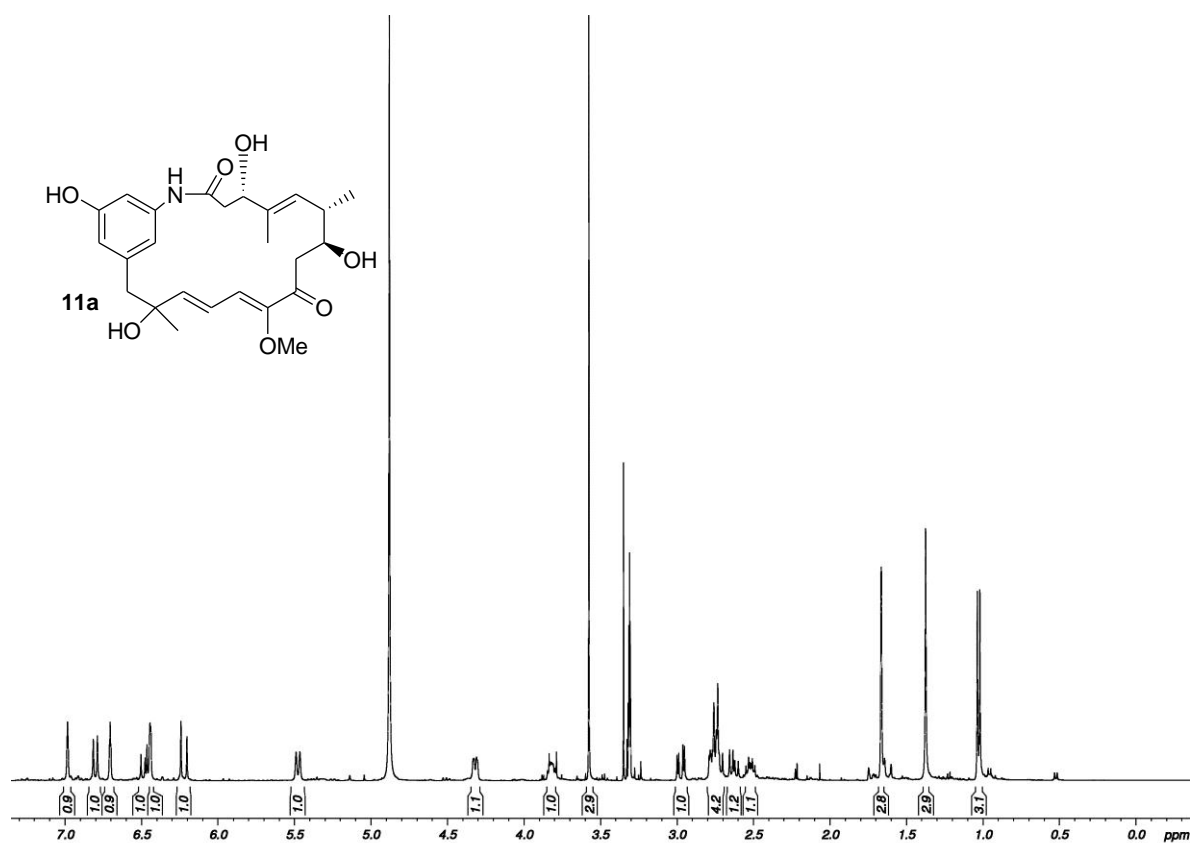
Abbildung 22: Kalibriergeraden zur Quantifizierung von Substanzen mit AP-3 **1c** identischem Chromophor mittels analytischer *reversed phase*-HPLC unter Verwendung der Computer-gestützten Auswertung mittels der Software DATALYS Azur 4.6. Die Daten wurden unter Verwendung der Säule C18-A (vgl. 6.1) und der Elutionsprogramme A (Flussrate = 1 mL/min) bzw. D (Flussrate = 2 mL/min) (vgl. 6.2). Authentisches AP-3 **1c** wurde durch FLORIAN TAFT³⁶ bereitgestellt und in Methanol verdünnt. Es wurden 40 μ L der erstellten Maßlösungen injiziert. Eine Verdünnung von 160 mg/L entspricht somit einer injizierten Menge von 6.4 μ g AP-3 **1c**. Zur Quantifizierung wurde grundsätzlich das Fermentationsendvolumen bestimmt und in die Berechnung mit einbezogen. Die resultierenden Konzentrationsangaben in der vorliegenden Arbeit beziehen sich somit nicht auf die tatsächliche Konzentration nach der Fermentation, sondern geben auf das Fermentationsanfangsvolumen standardisierte Ansamitocin-Titer an.

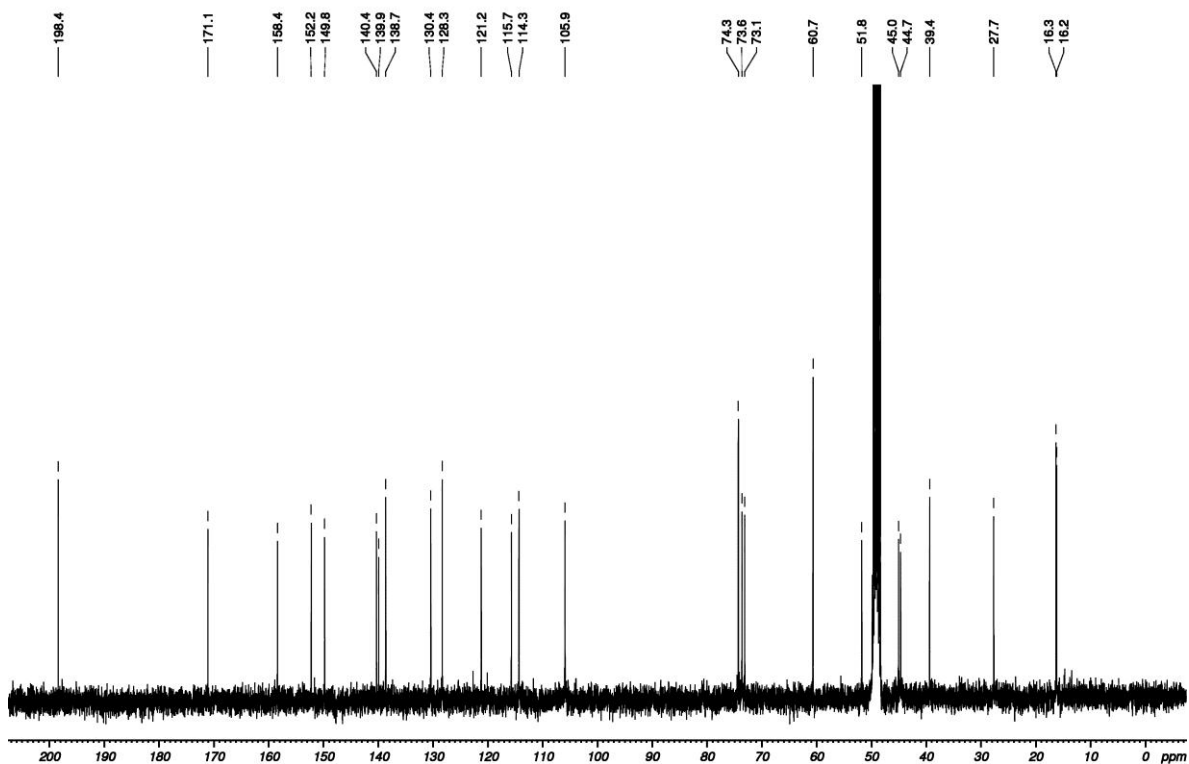
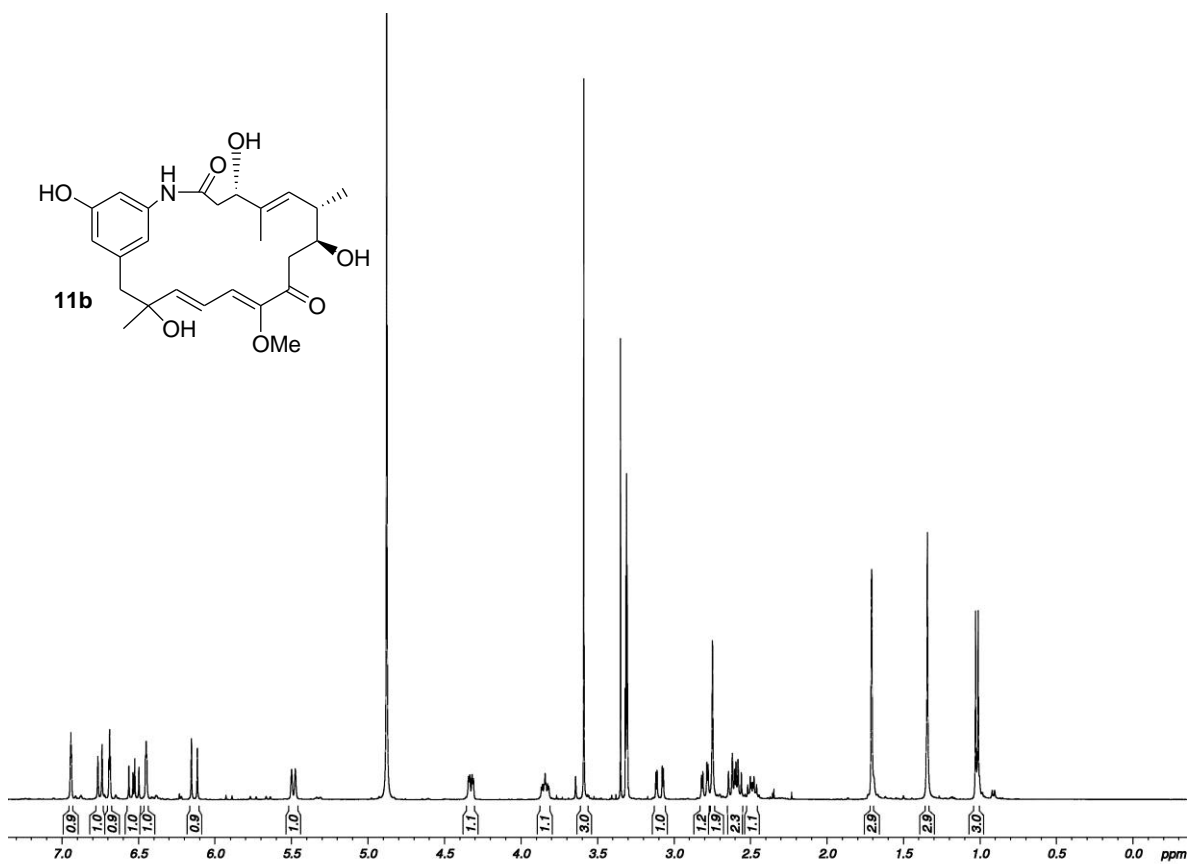
7.2 NMR-Spektren

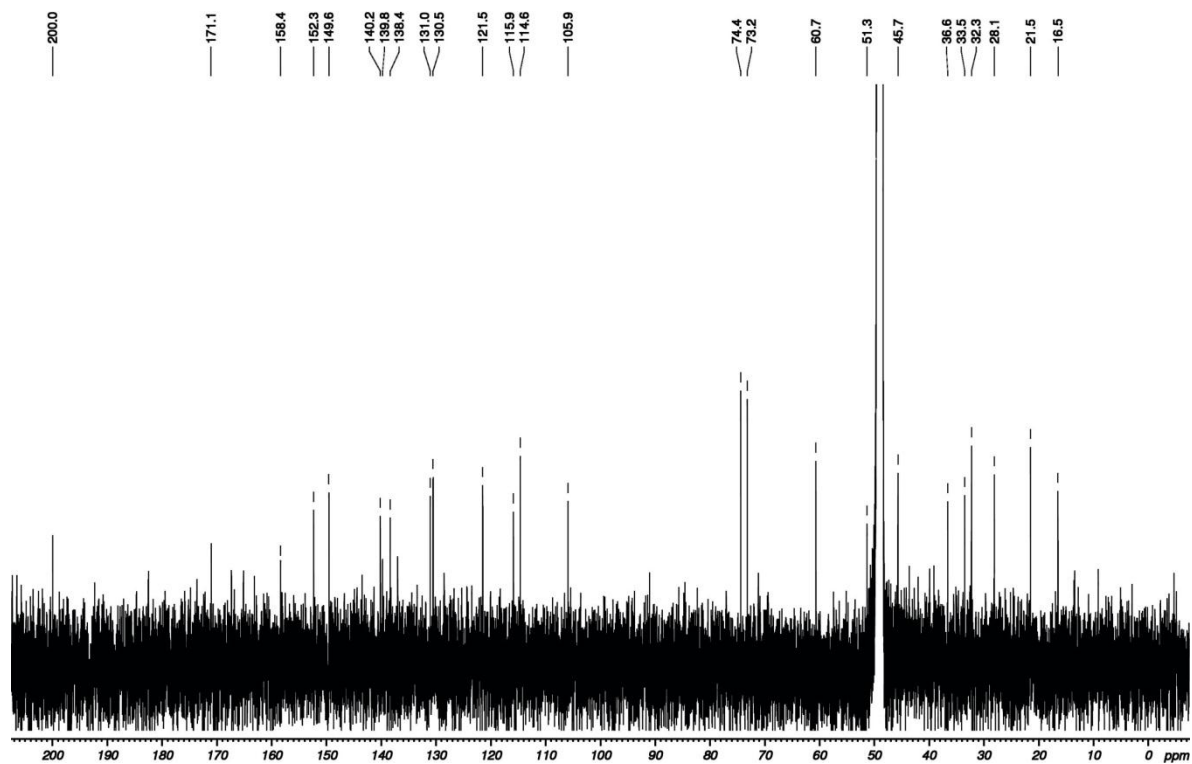
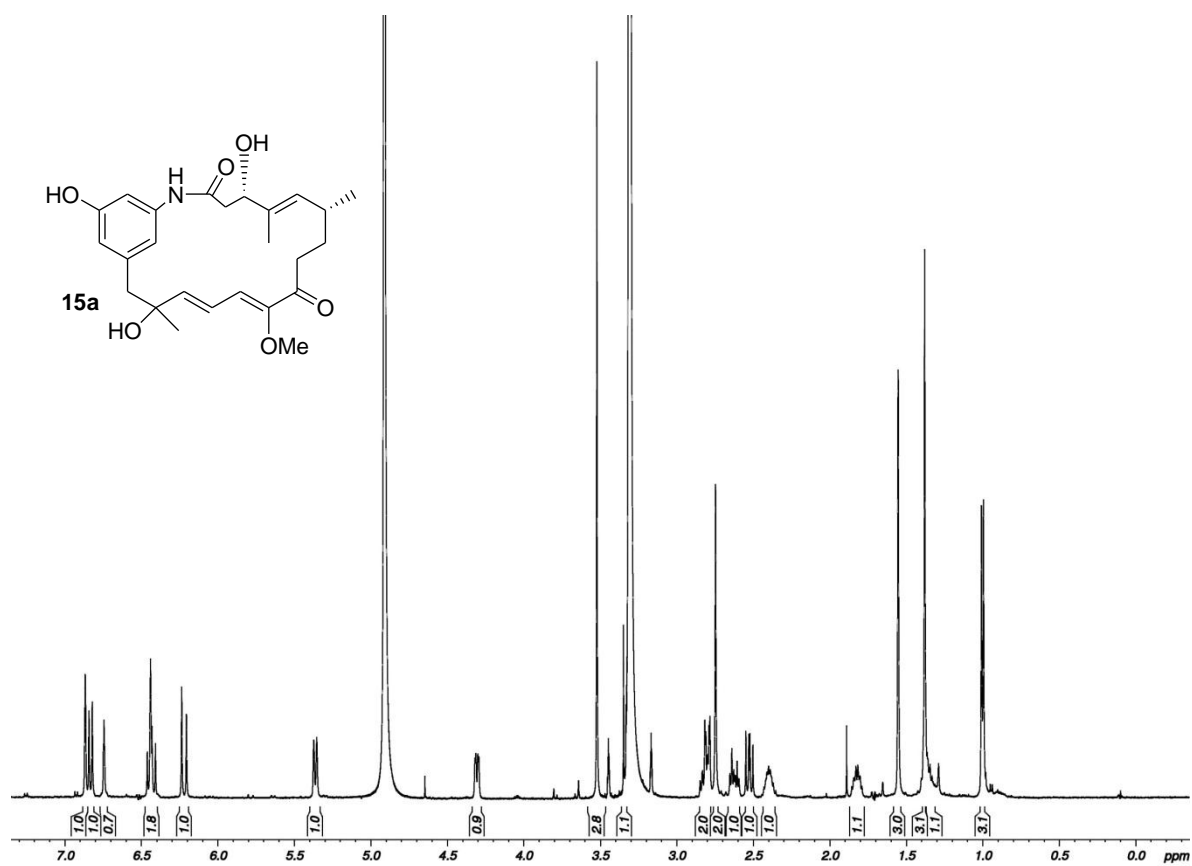


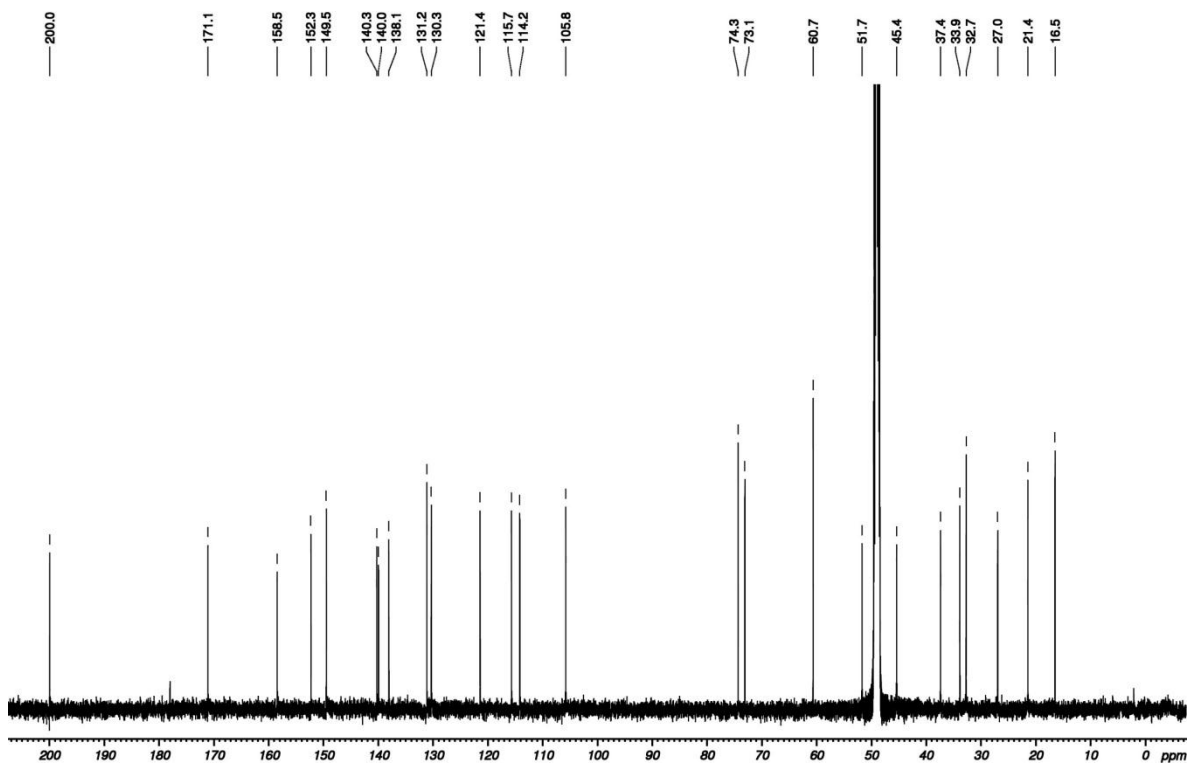
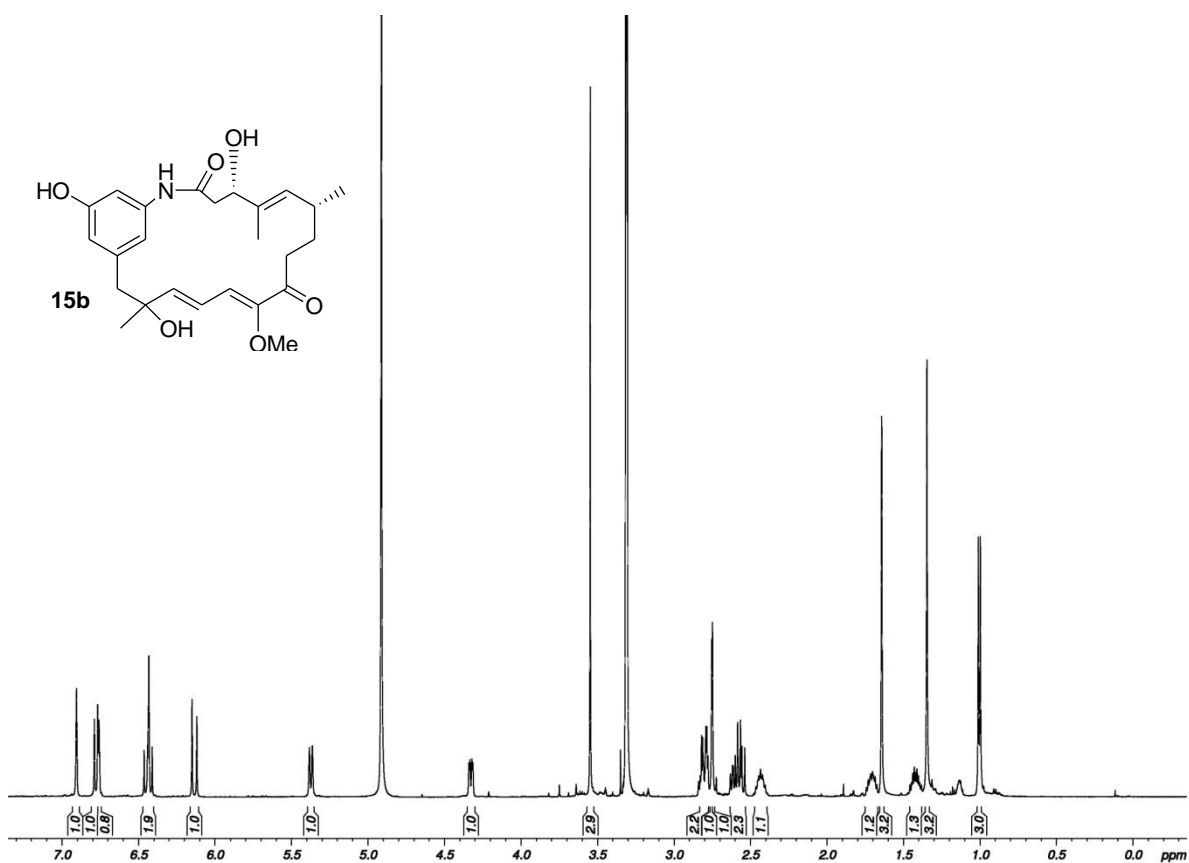


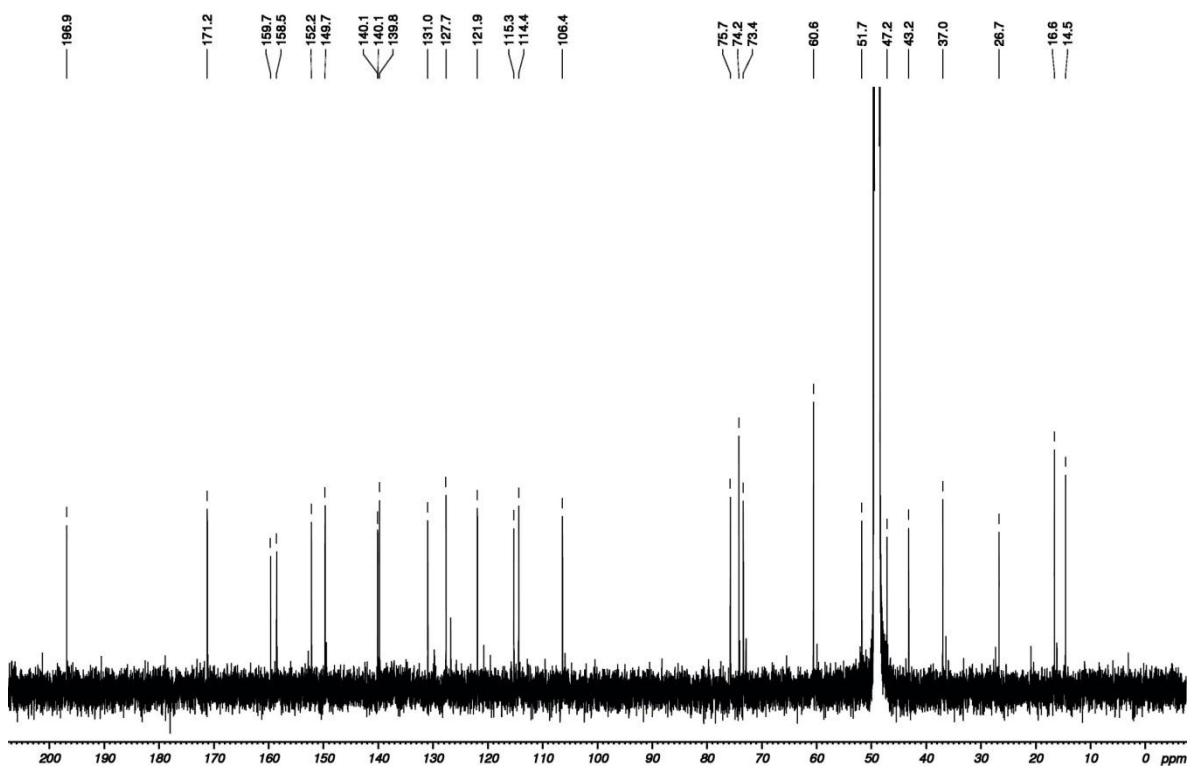
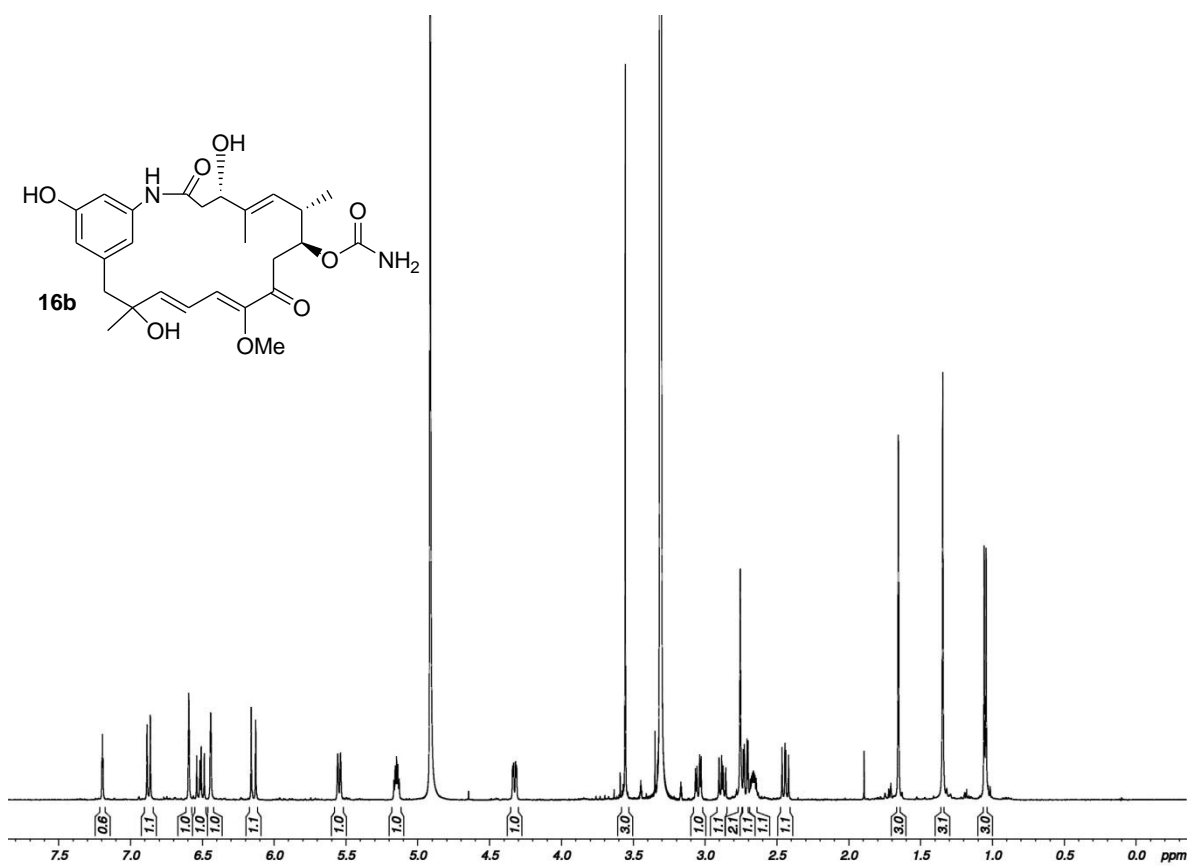


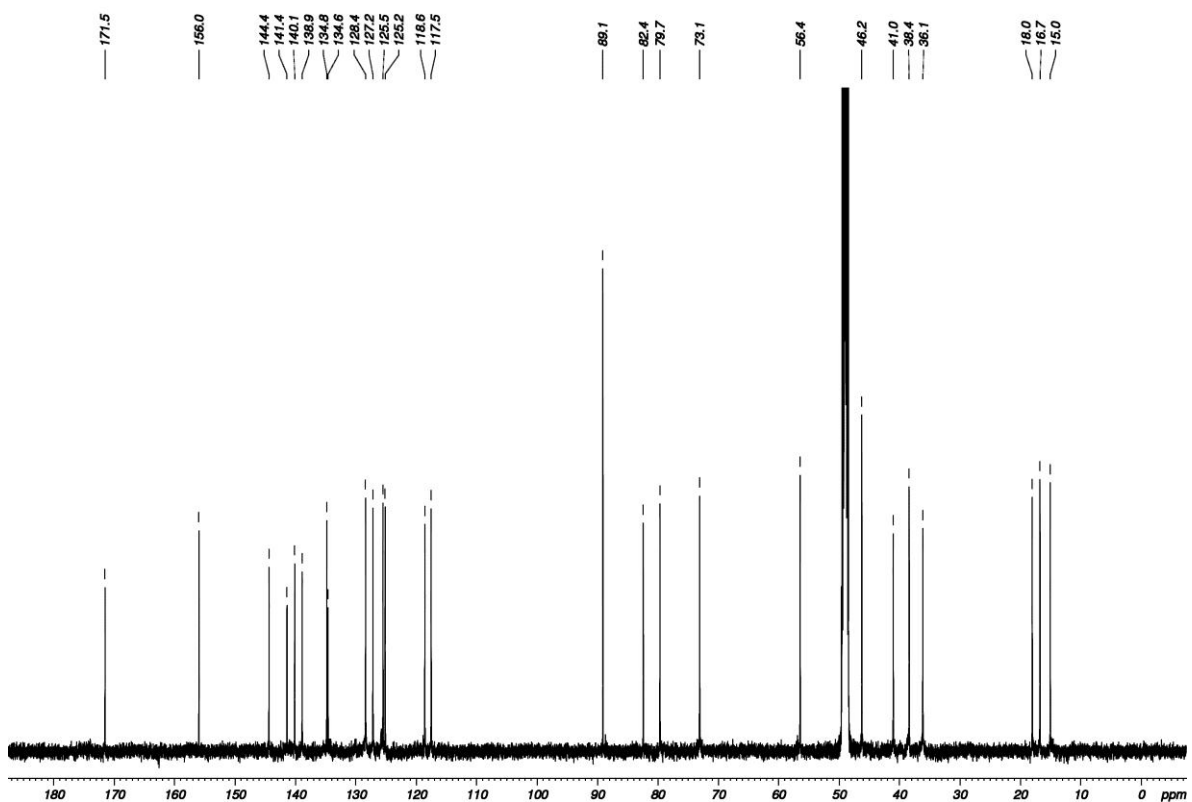


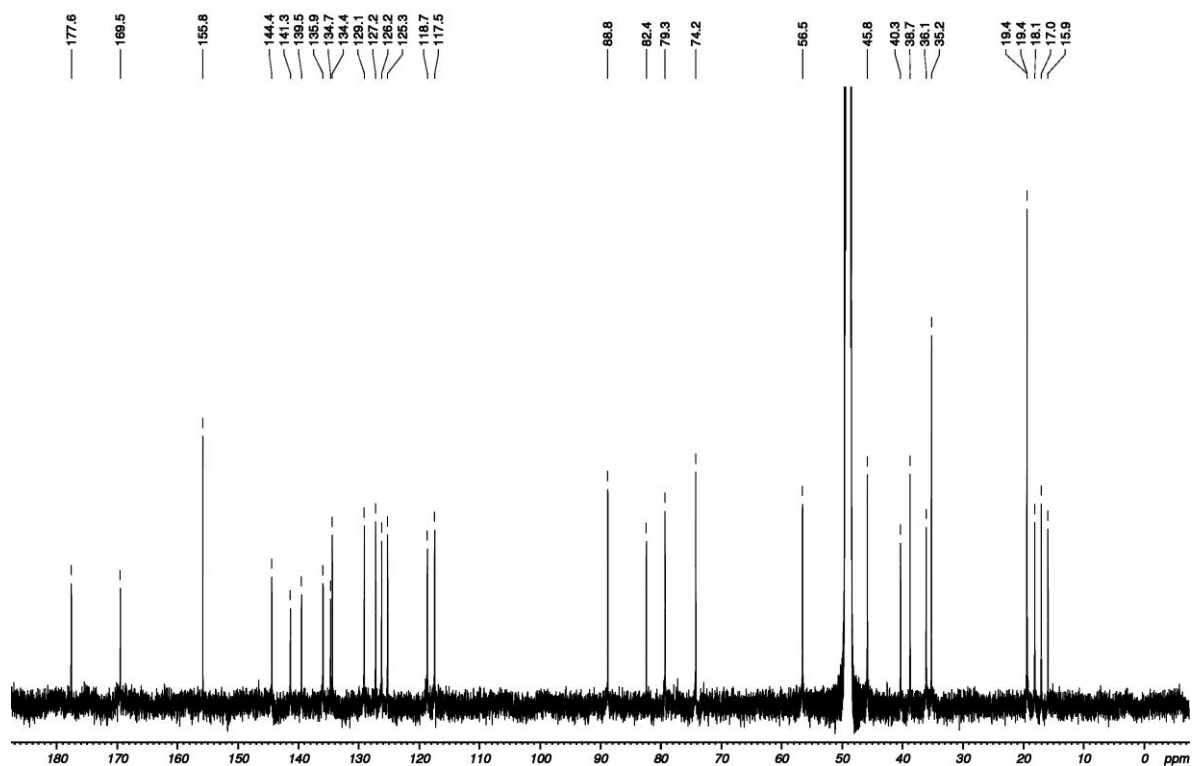
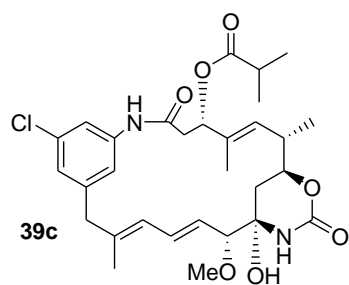


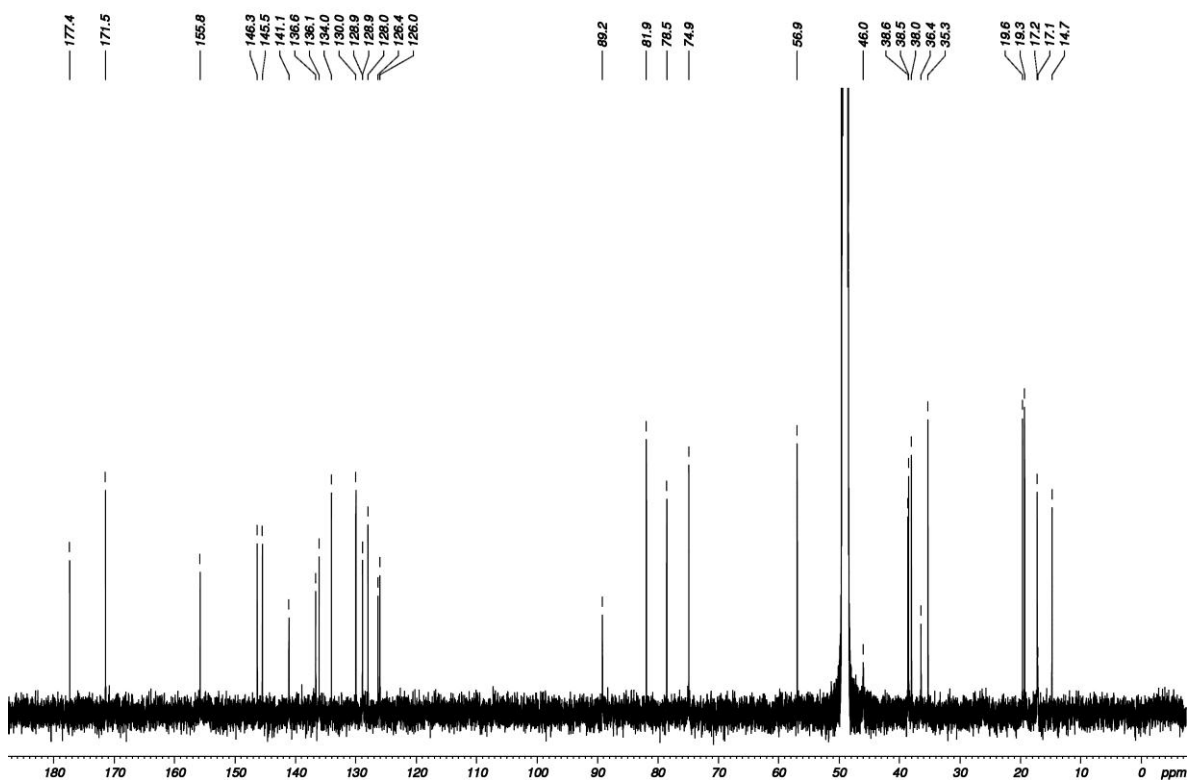
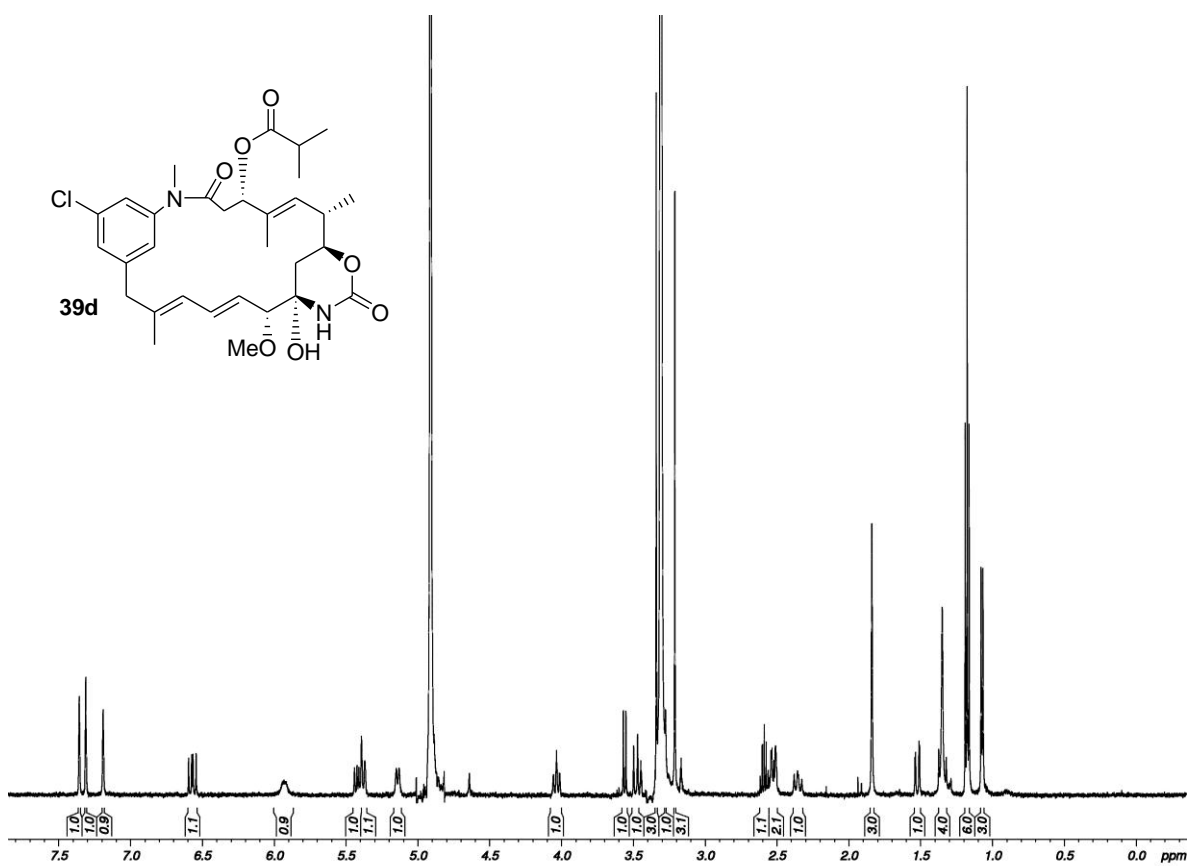


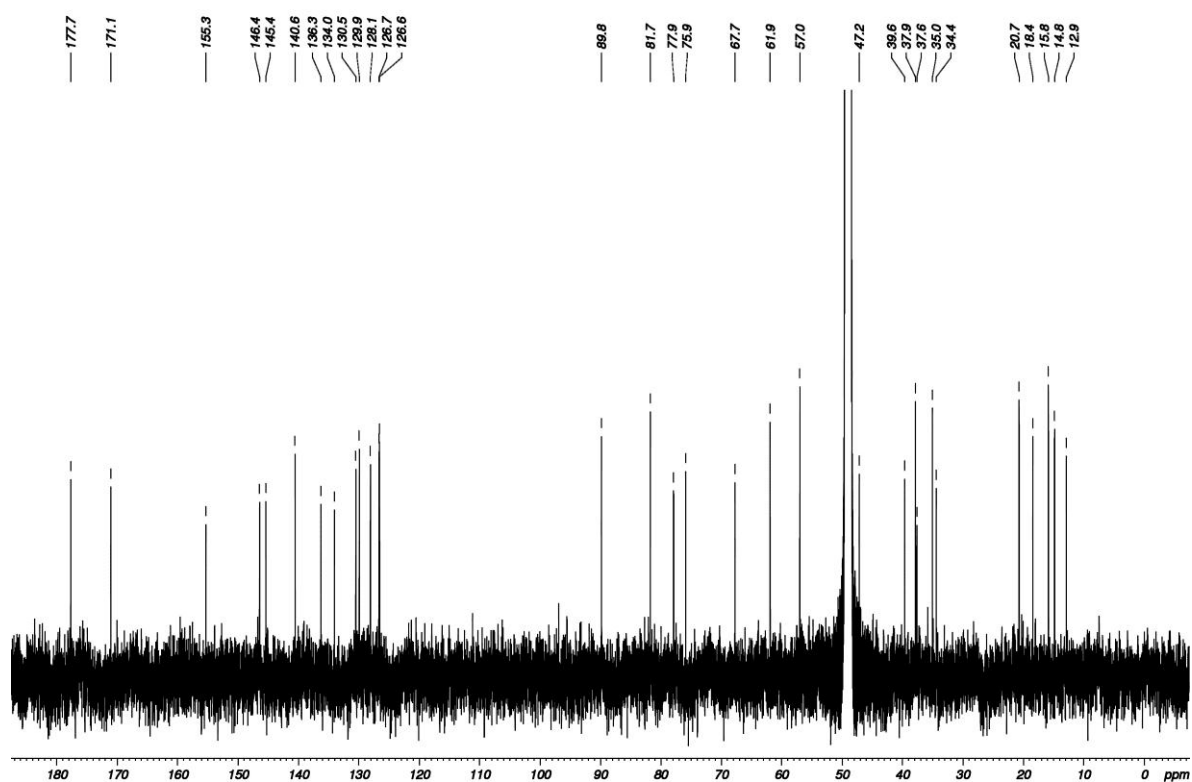
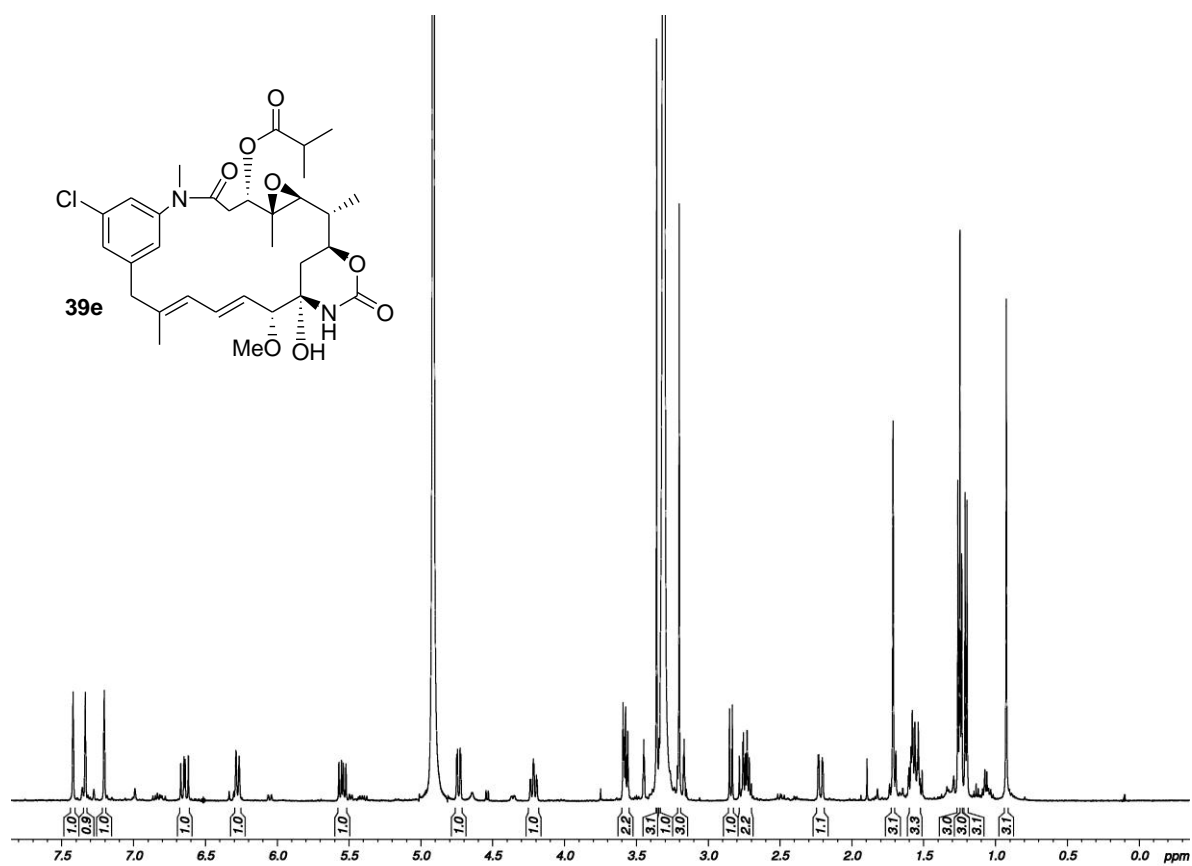


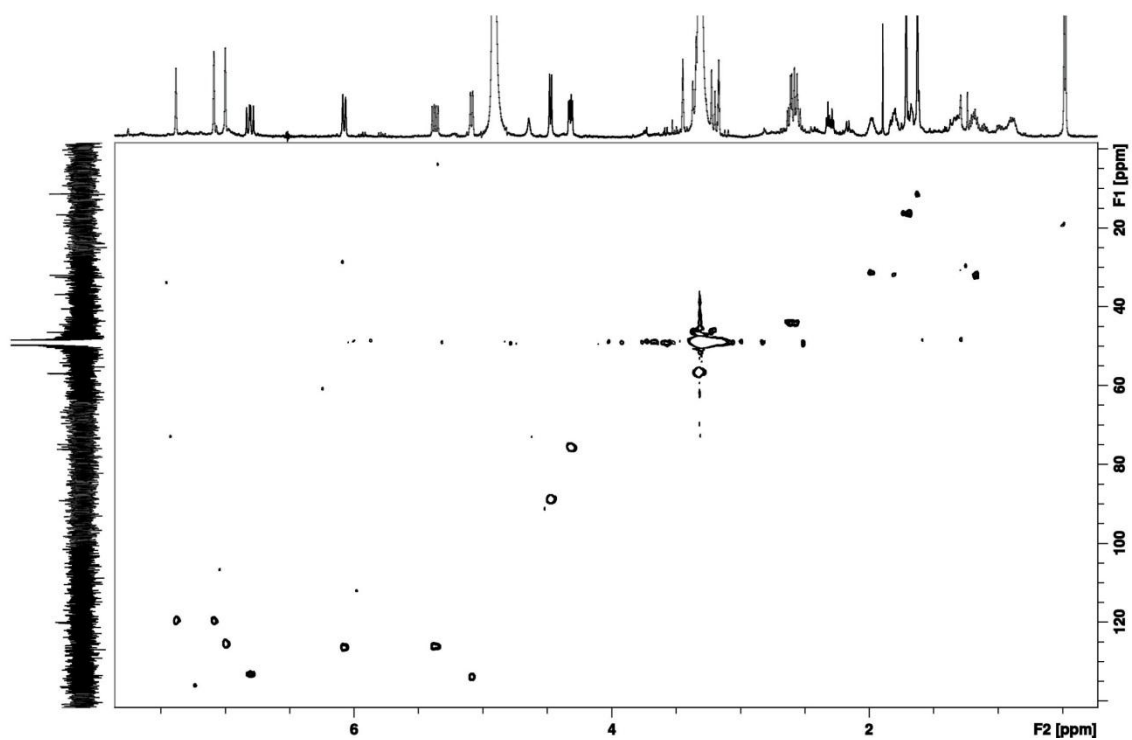
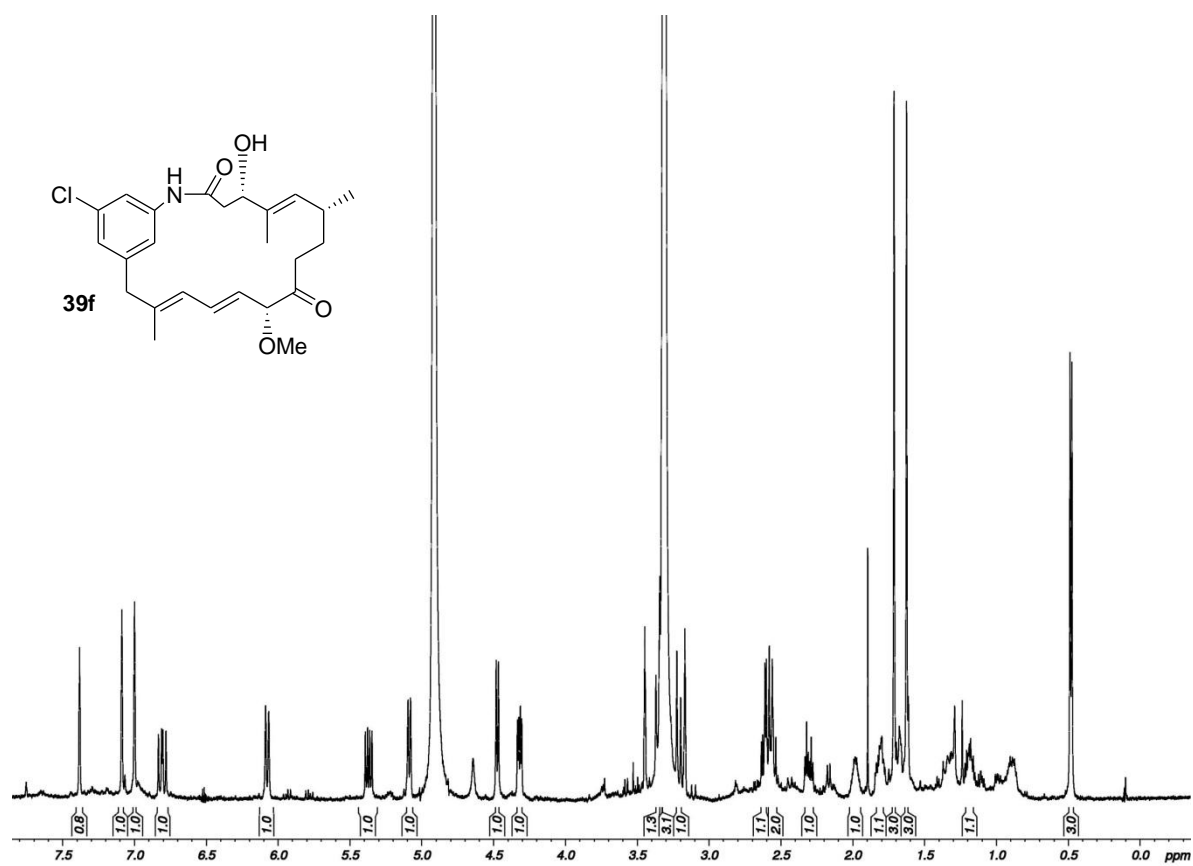


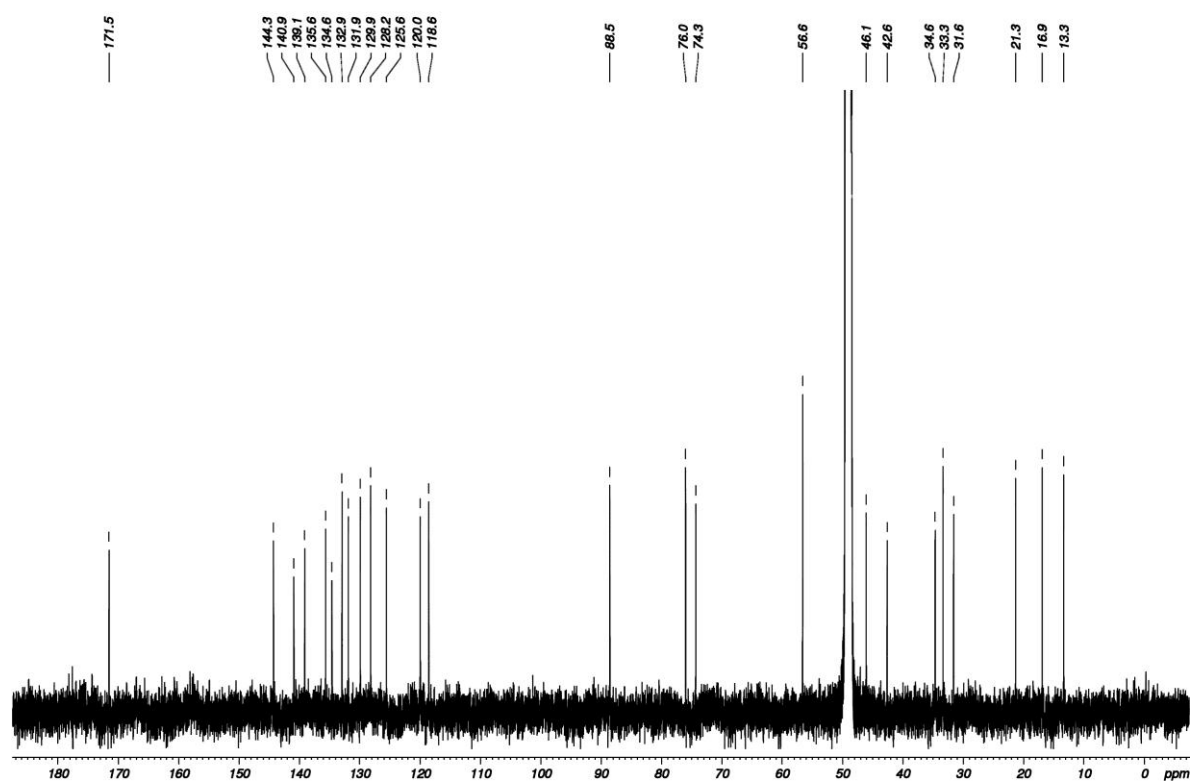
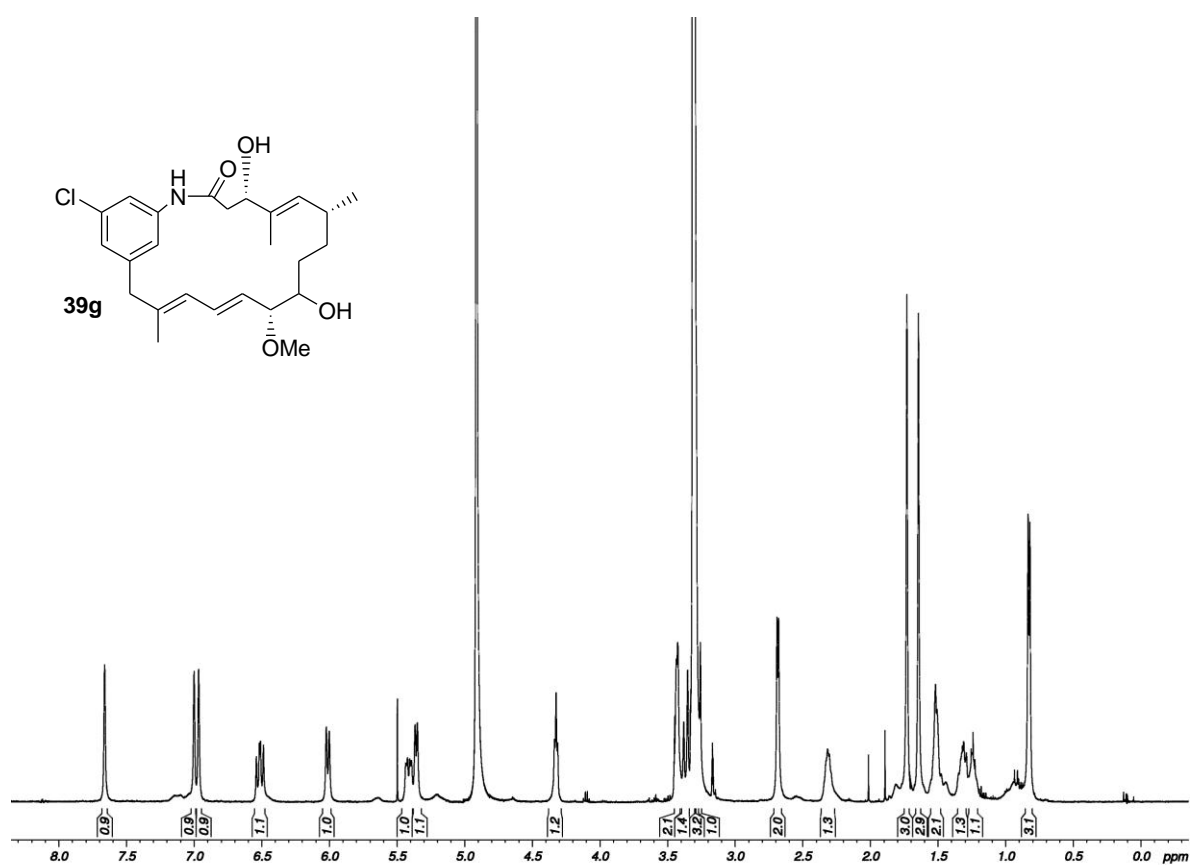


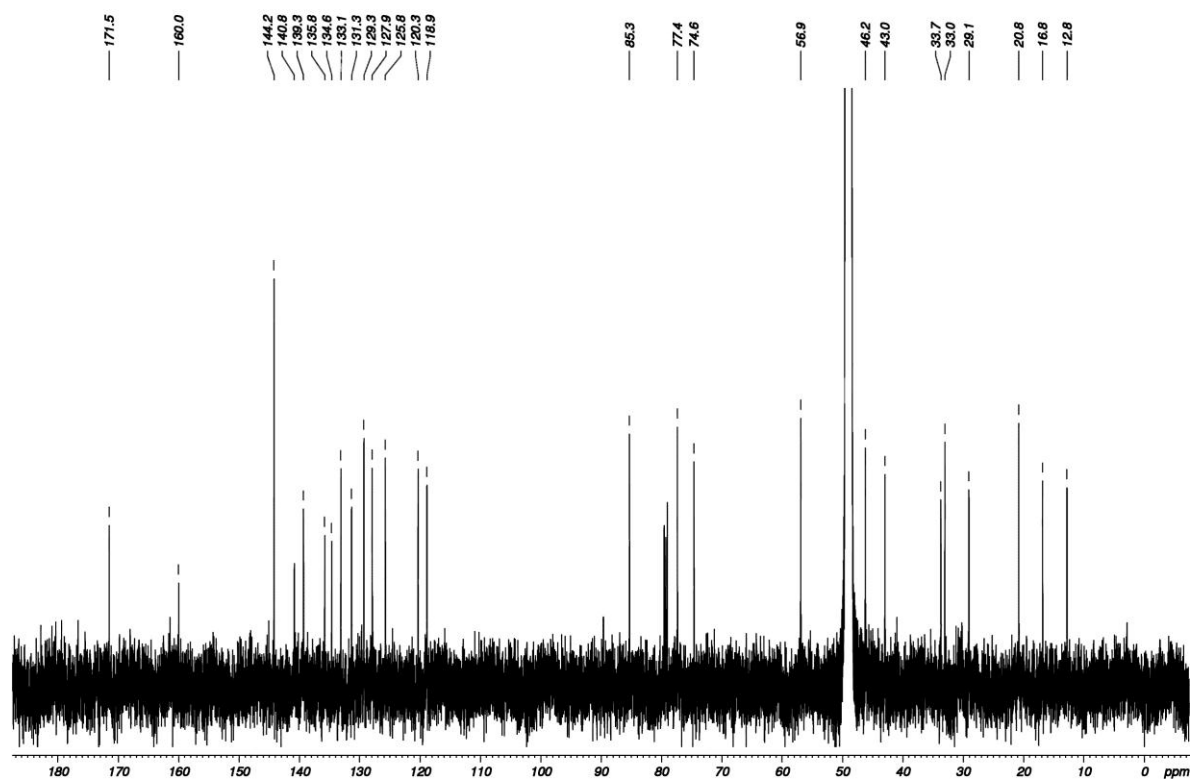
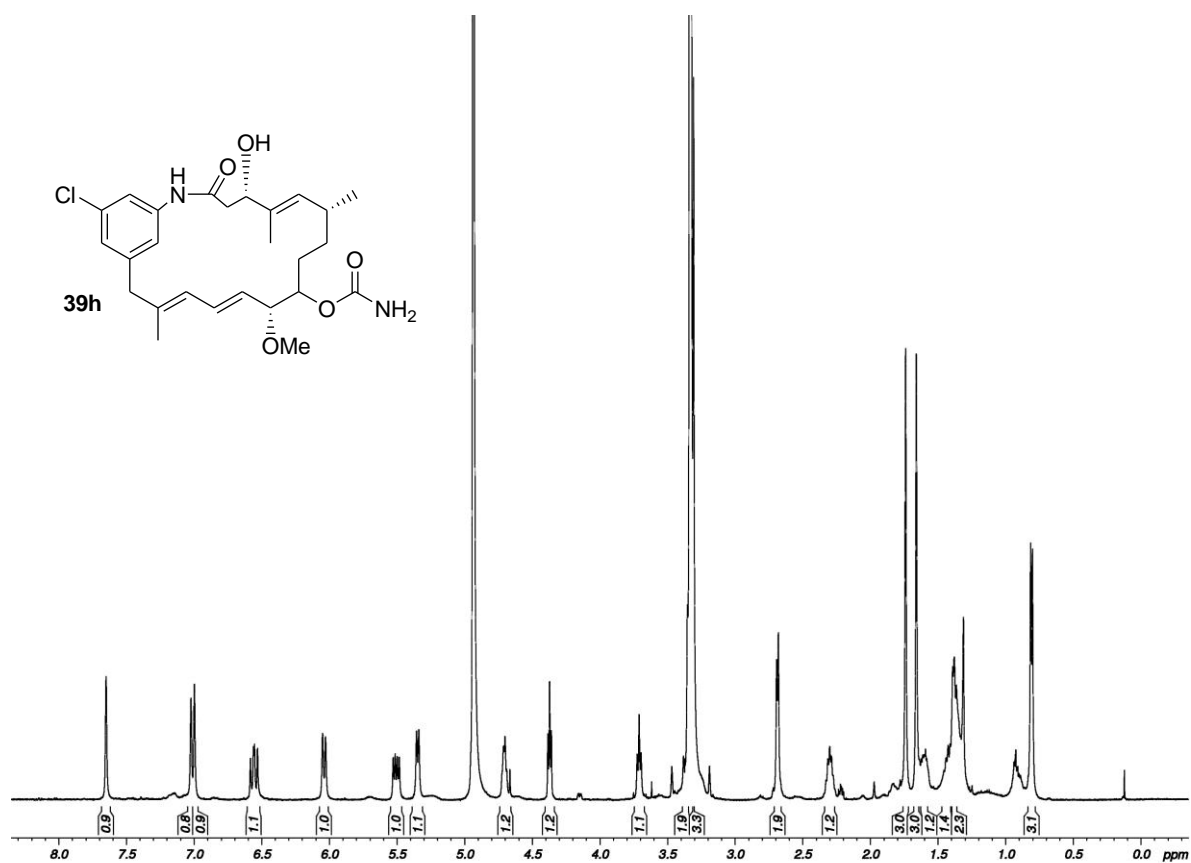


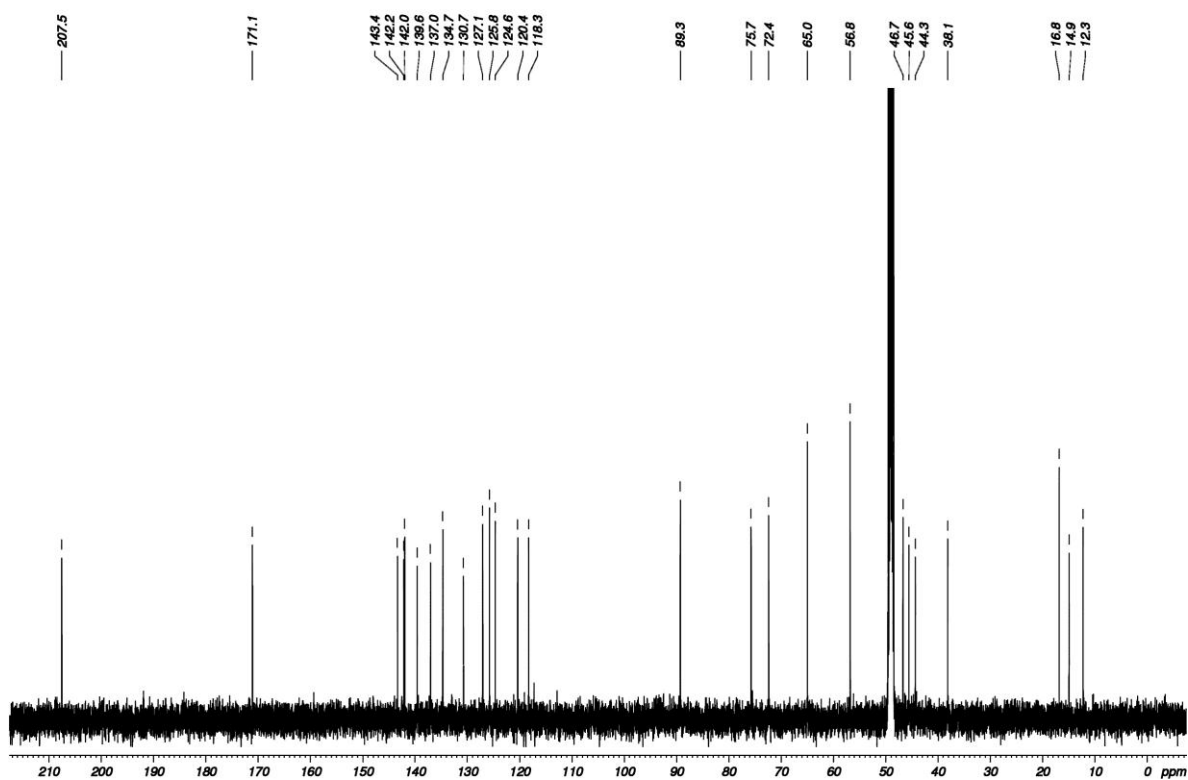
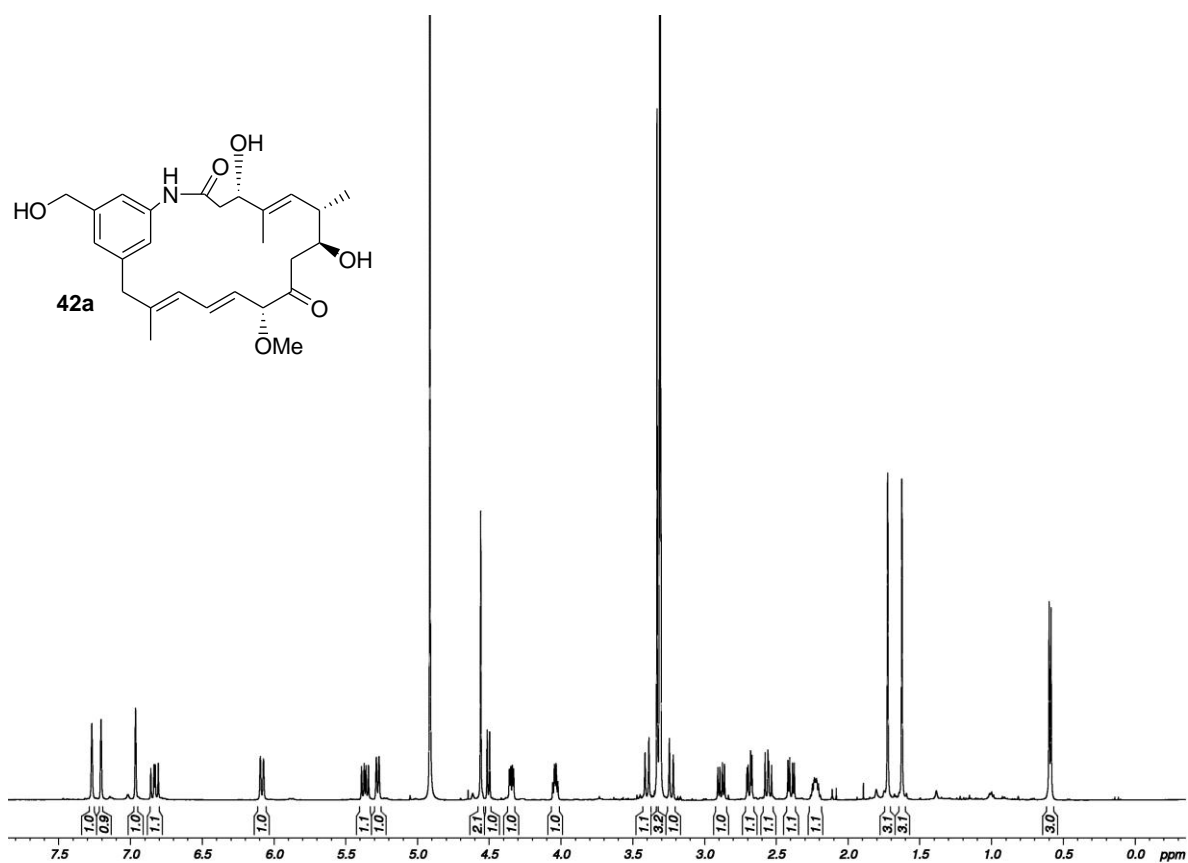


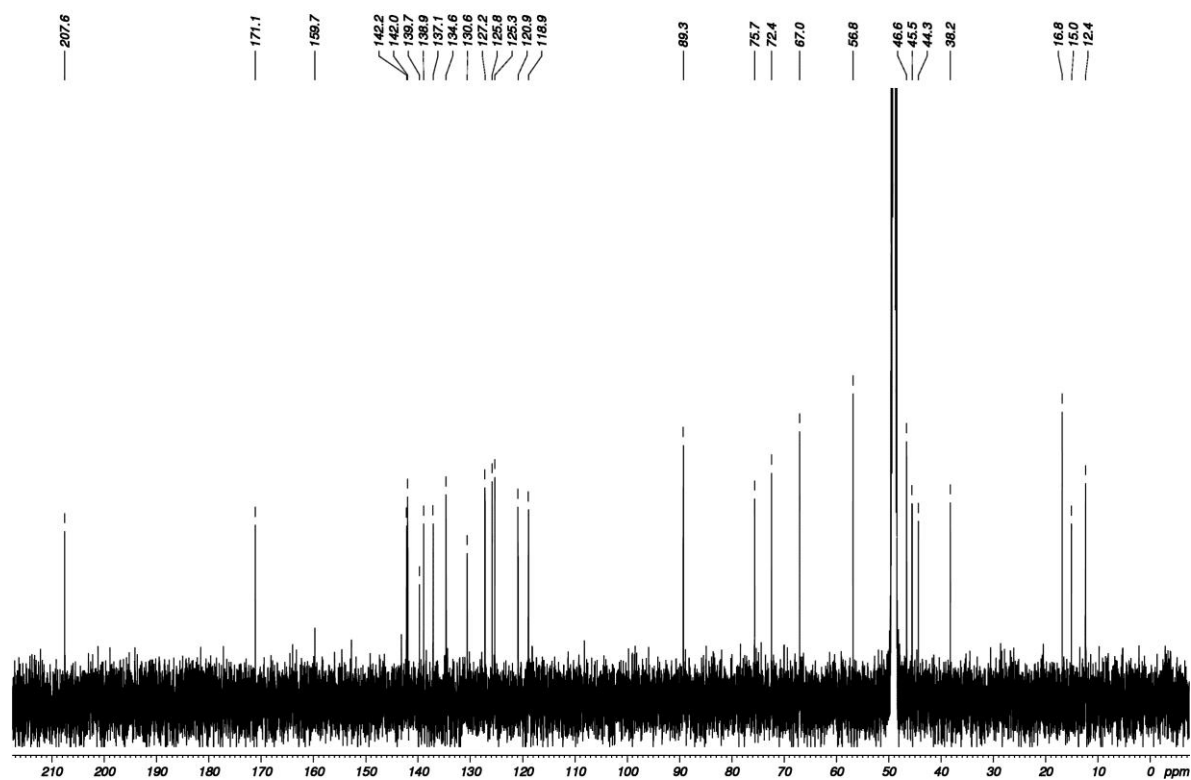
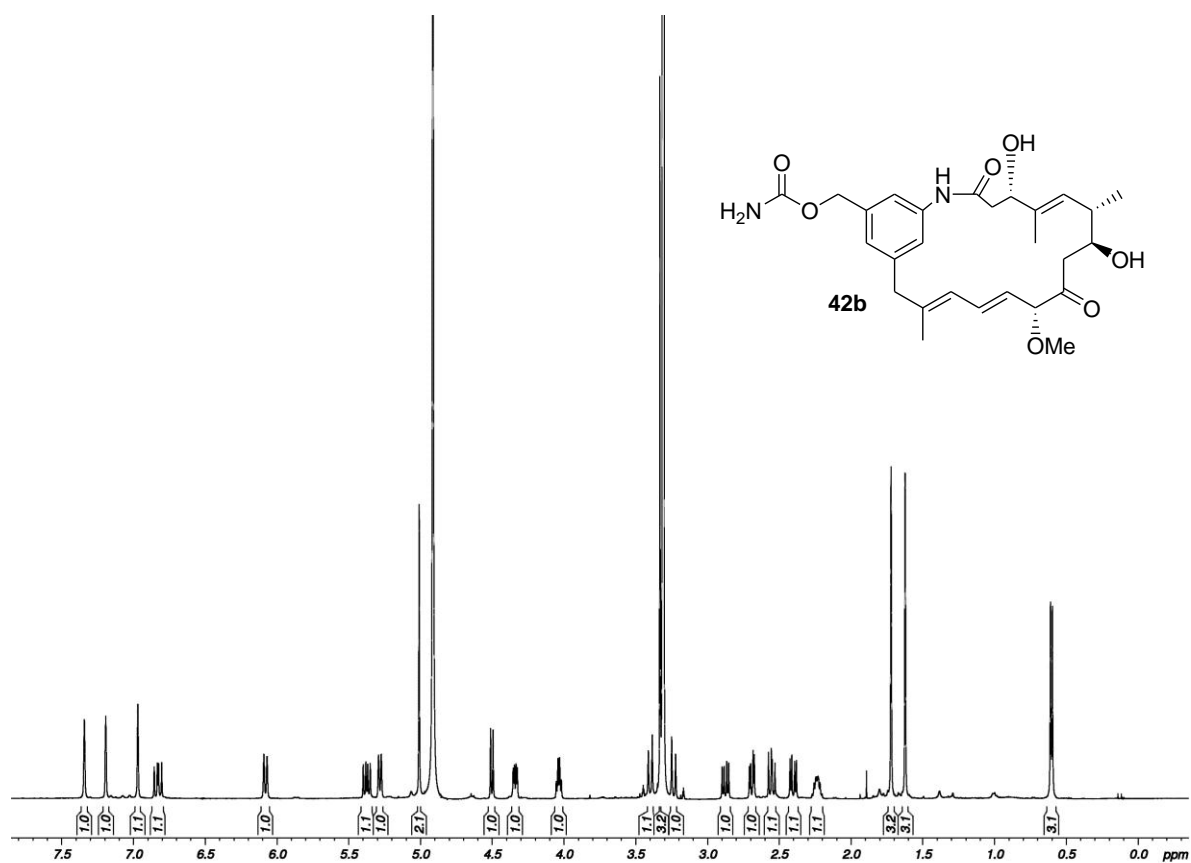


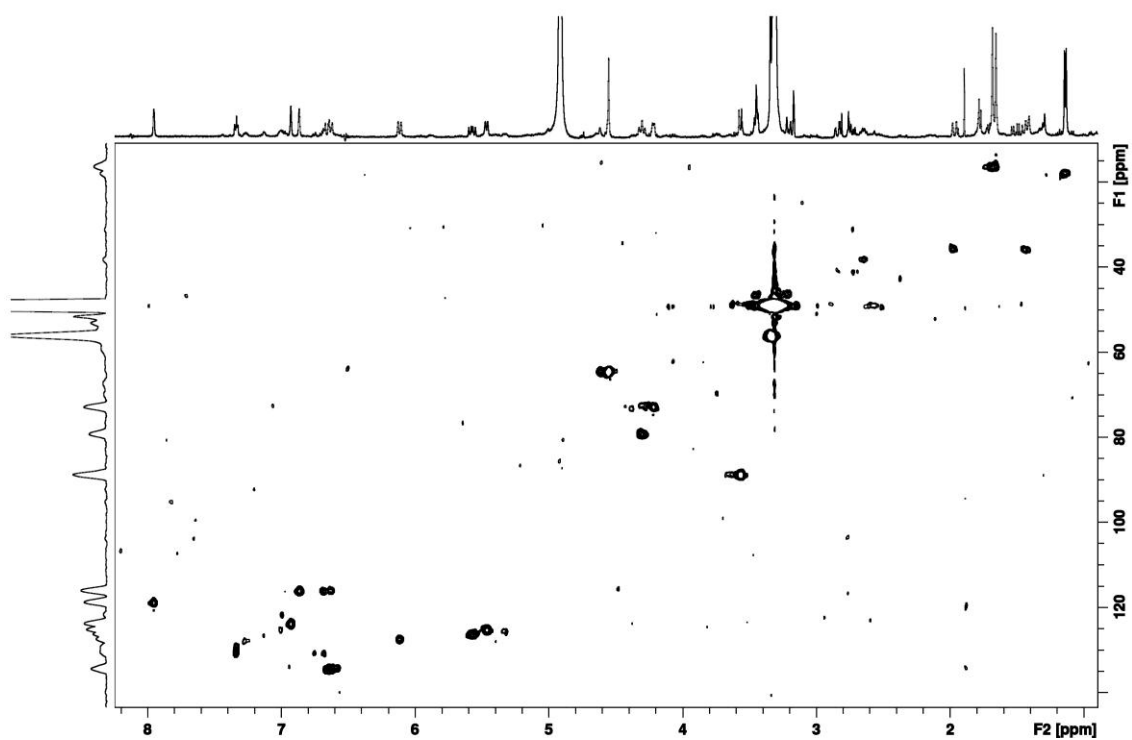
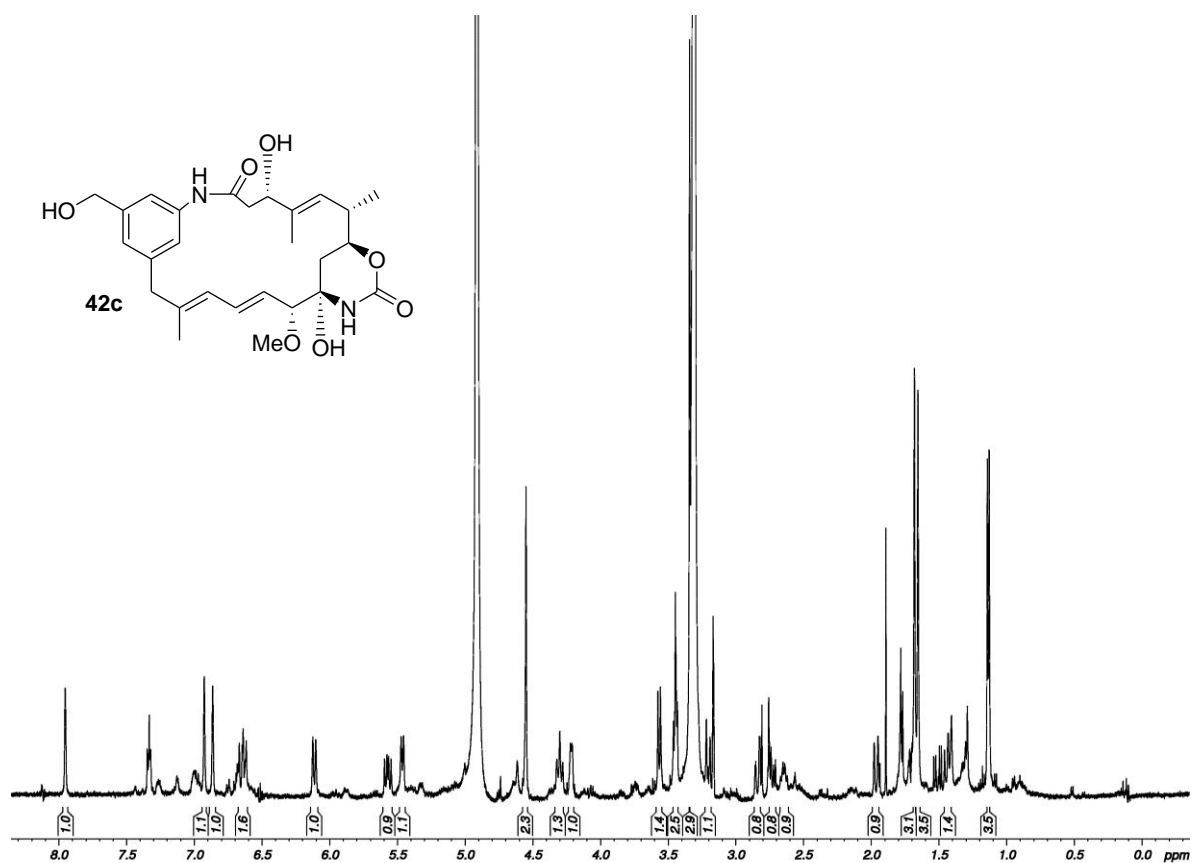


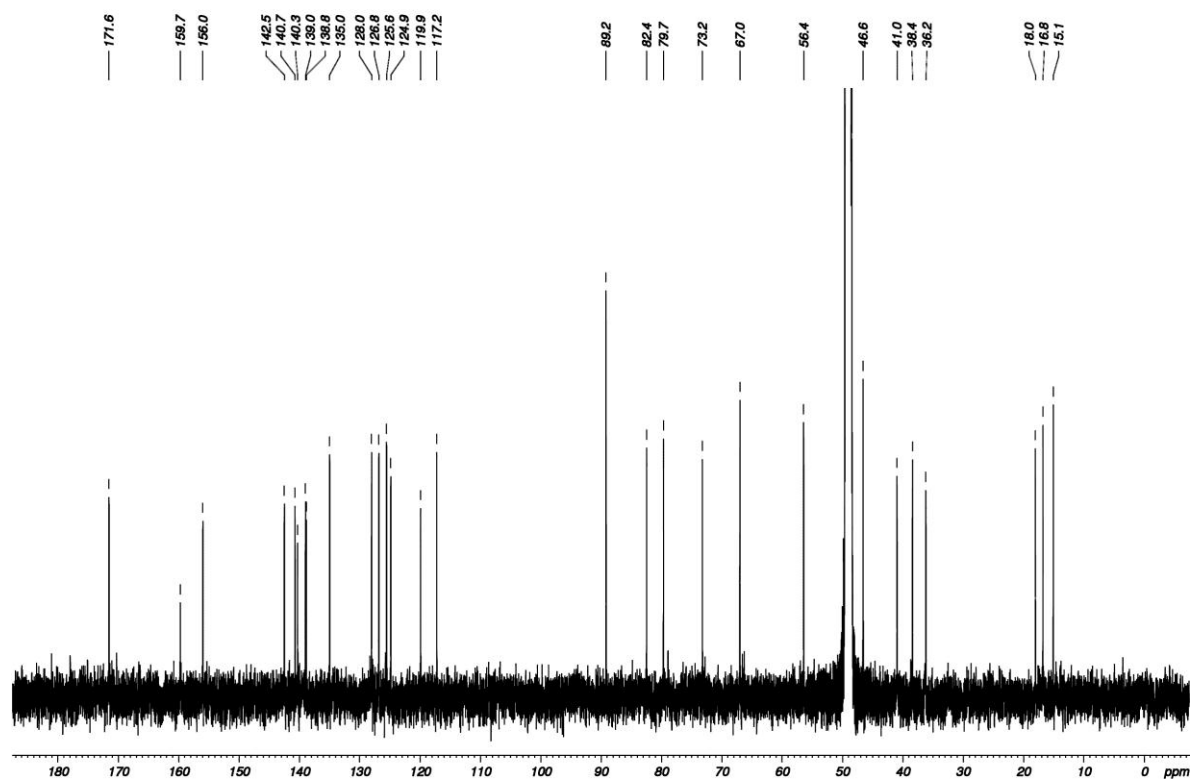
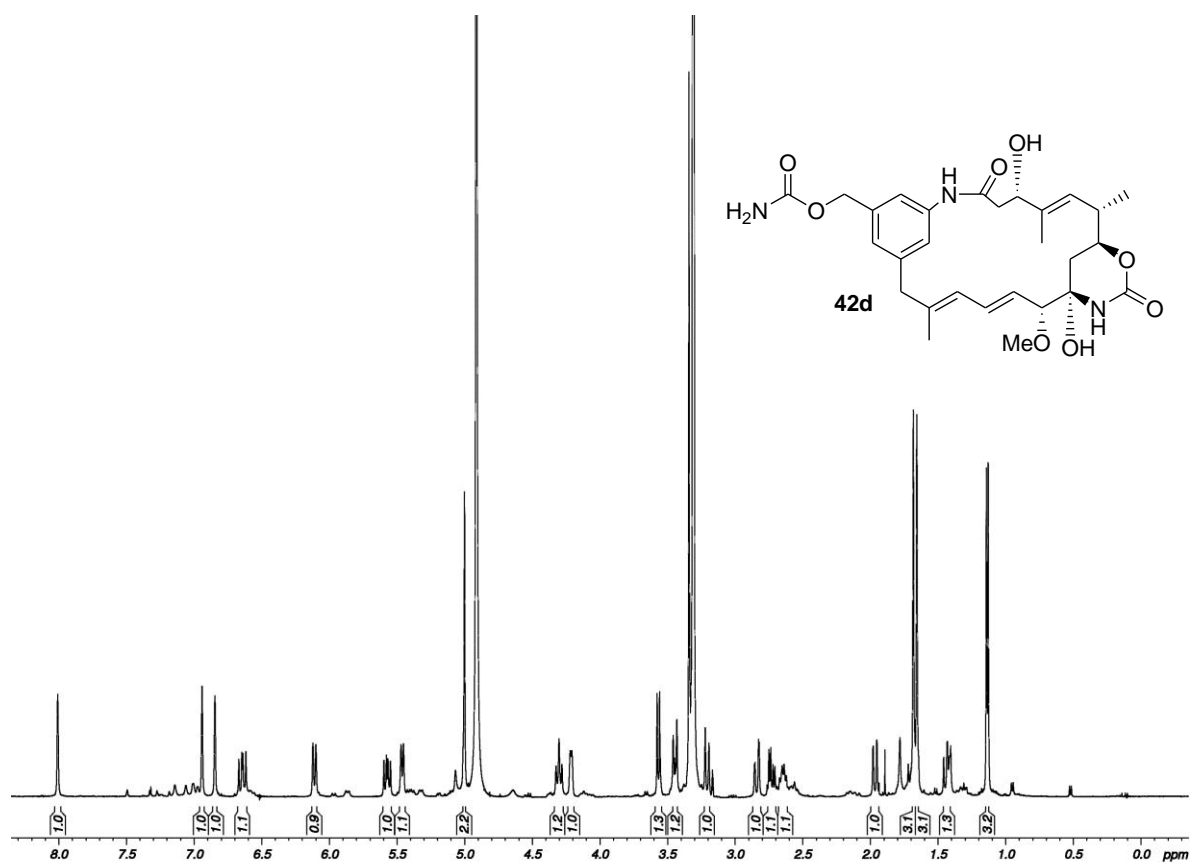


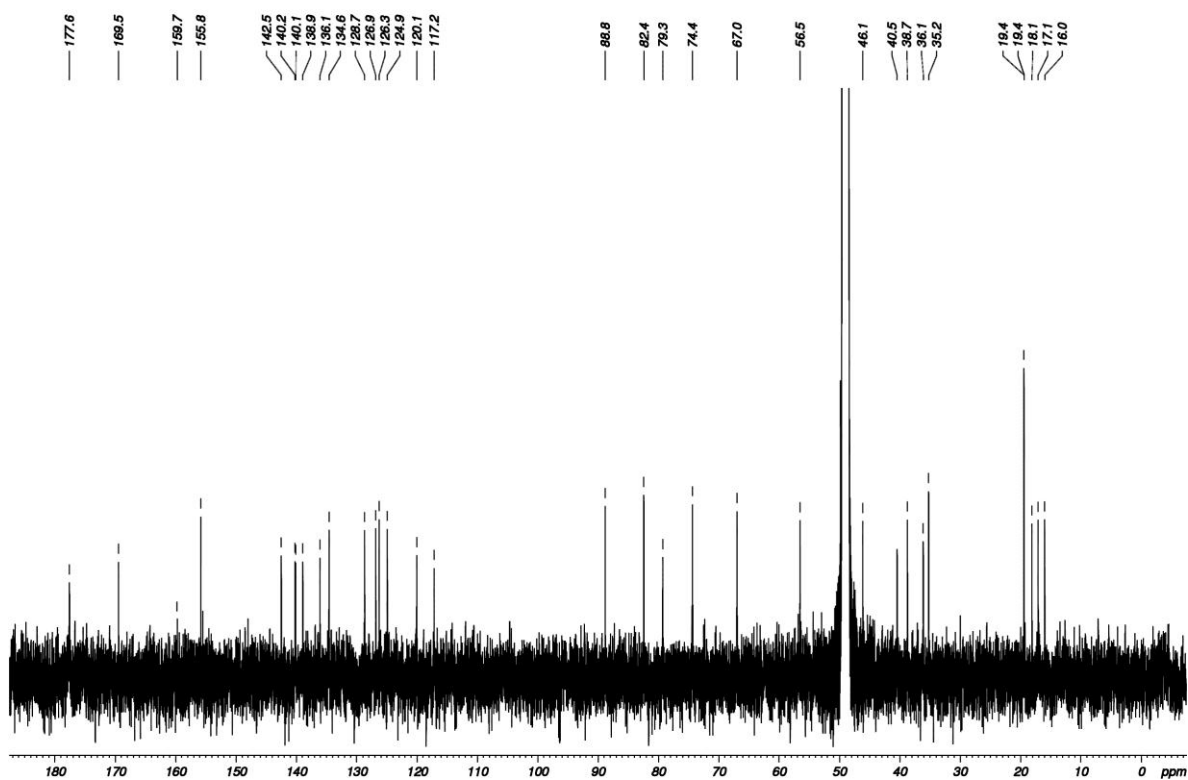
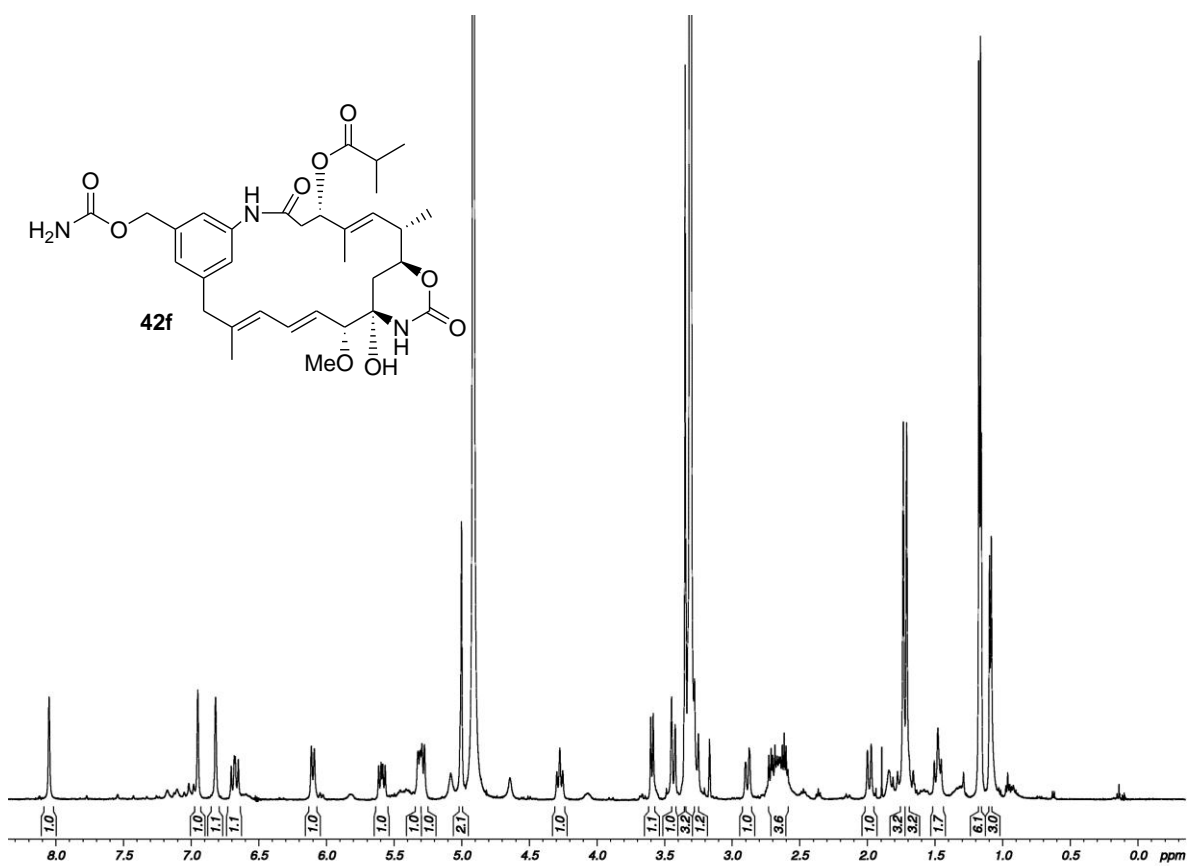


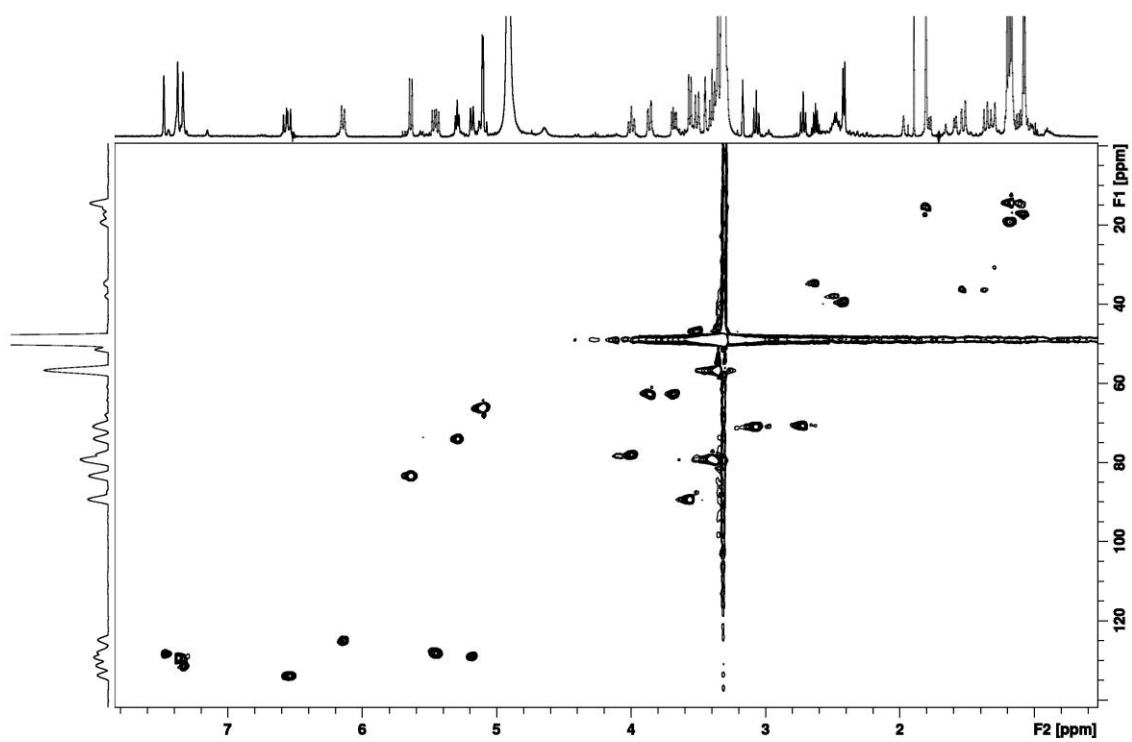
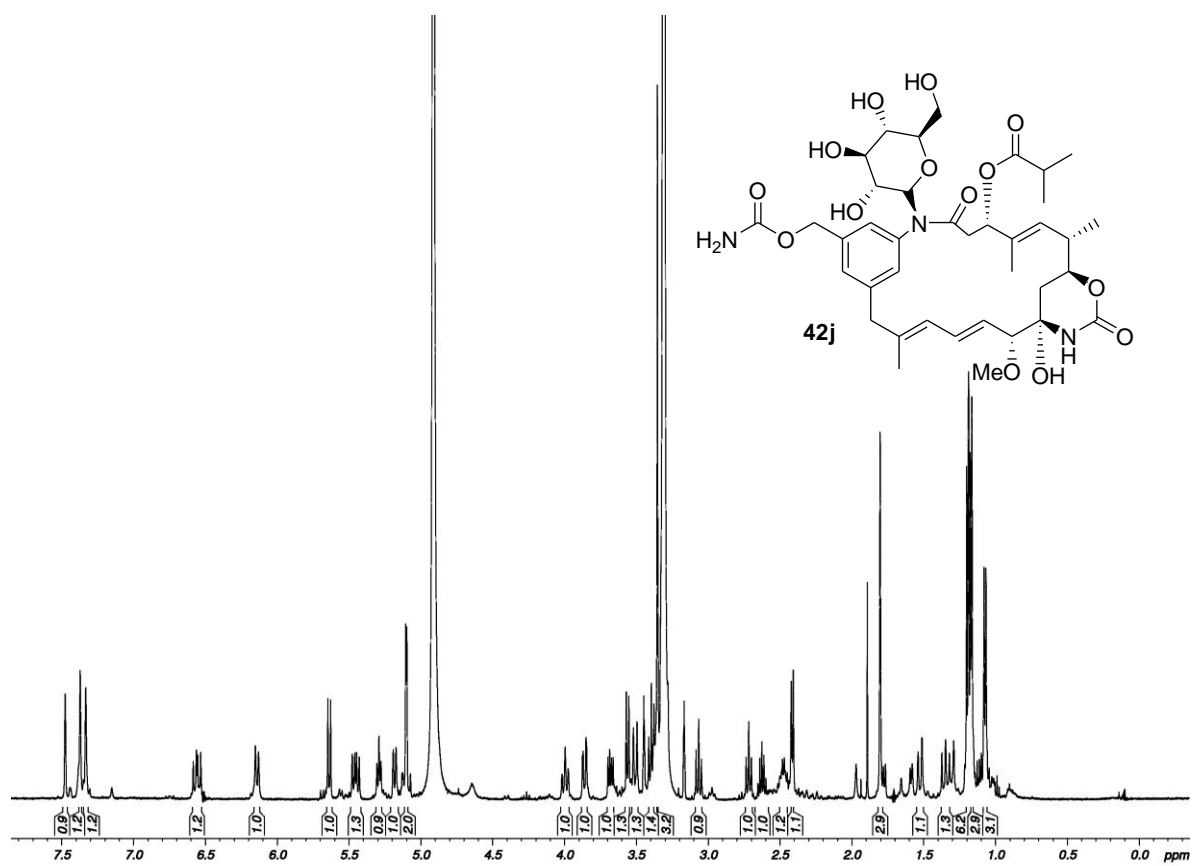


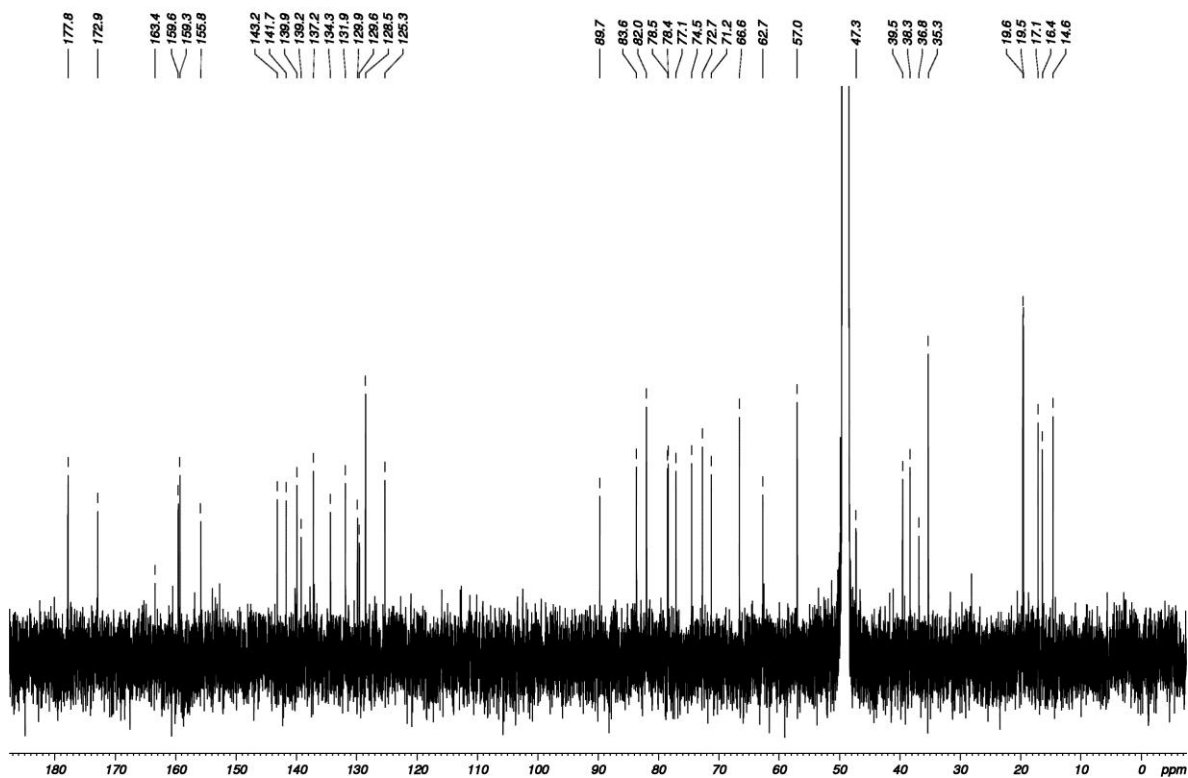
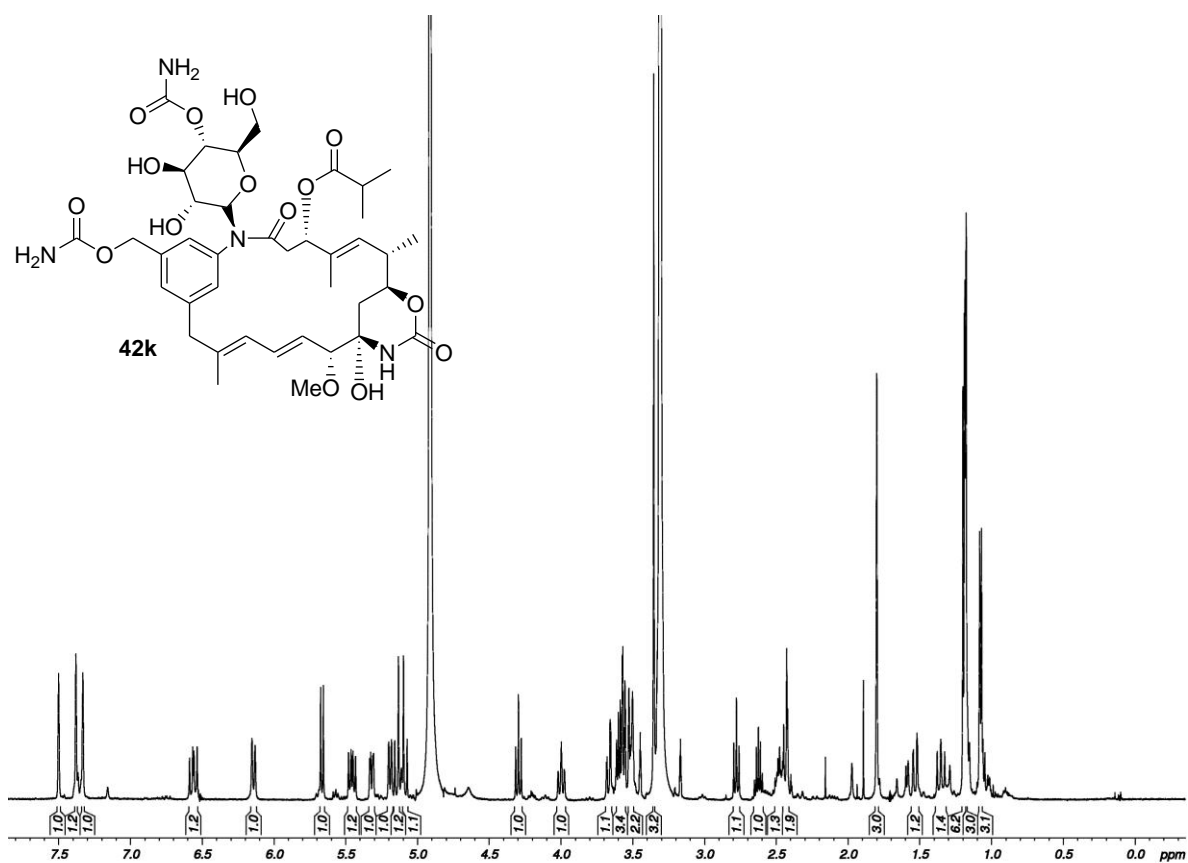


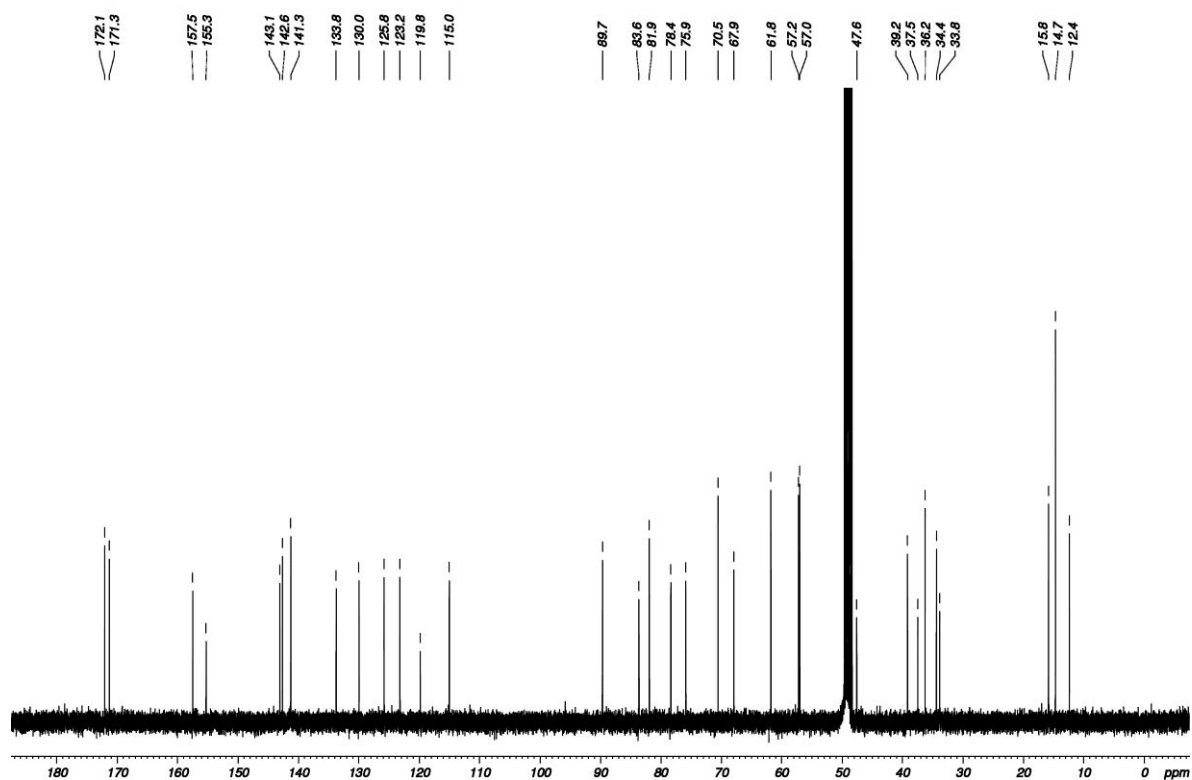
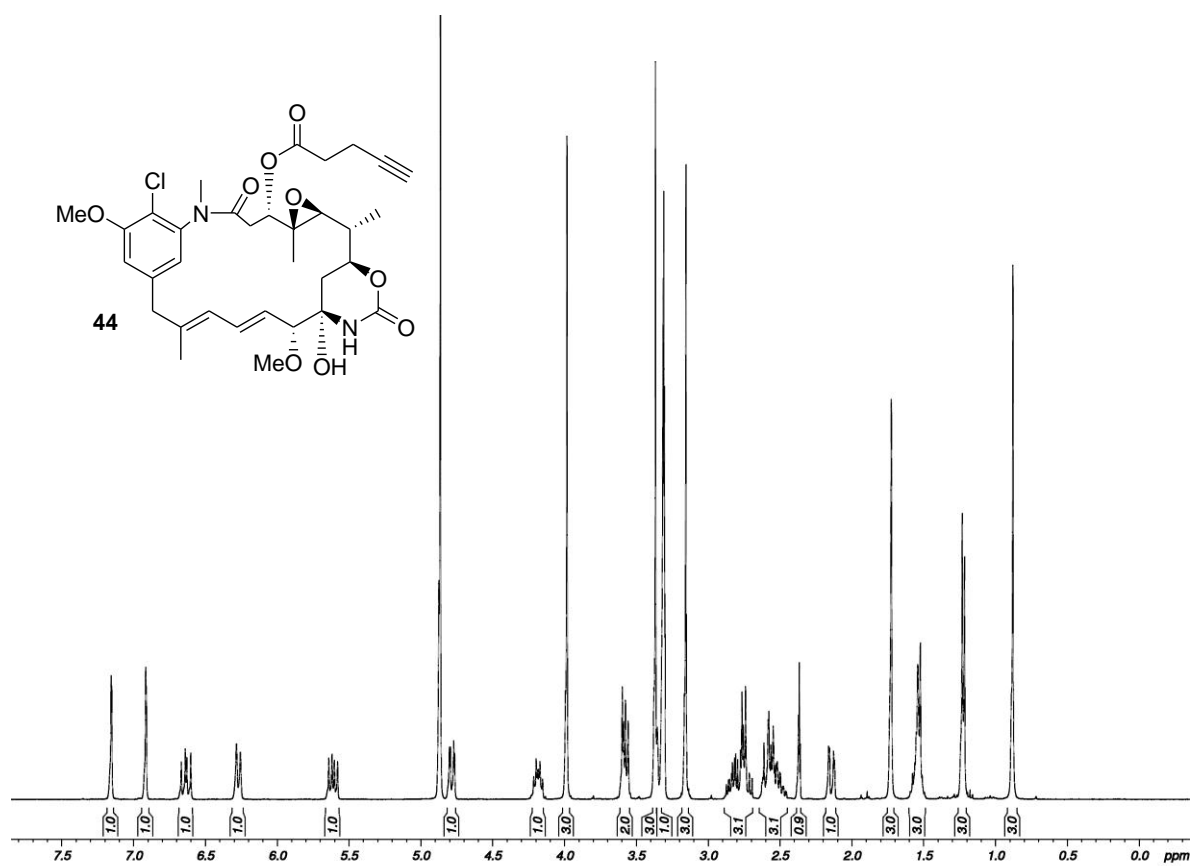


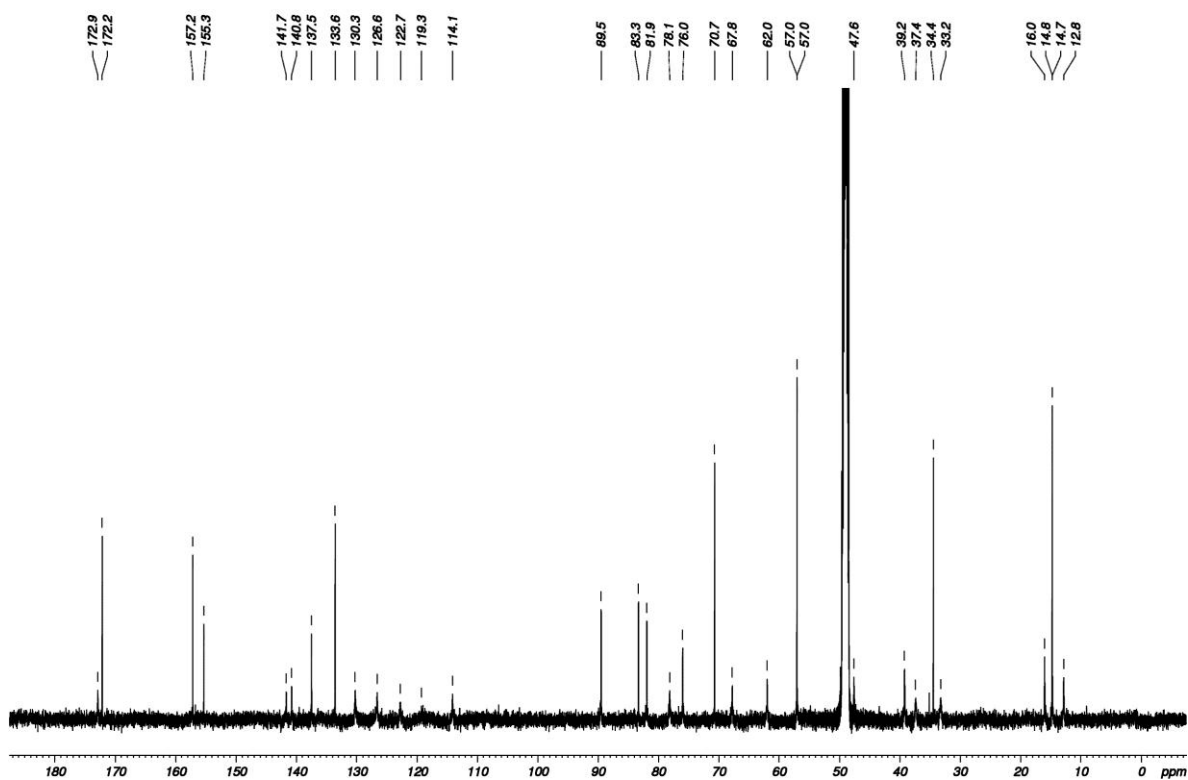
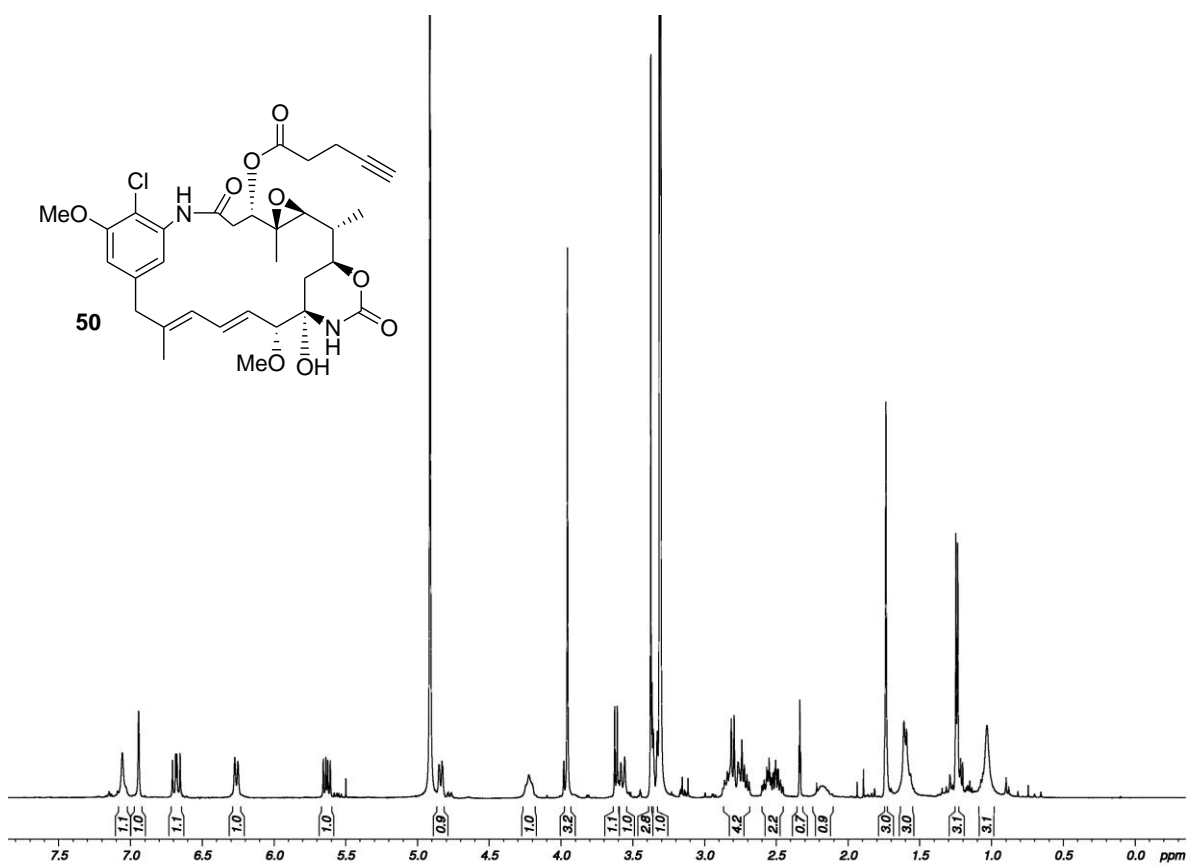


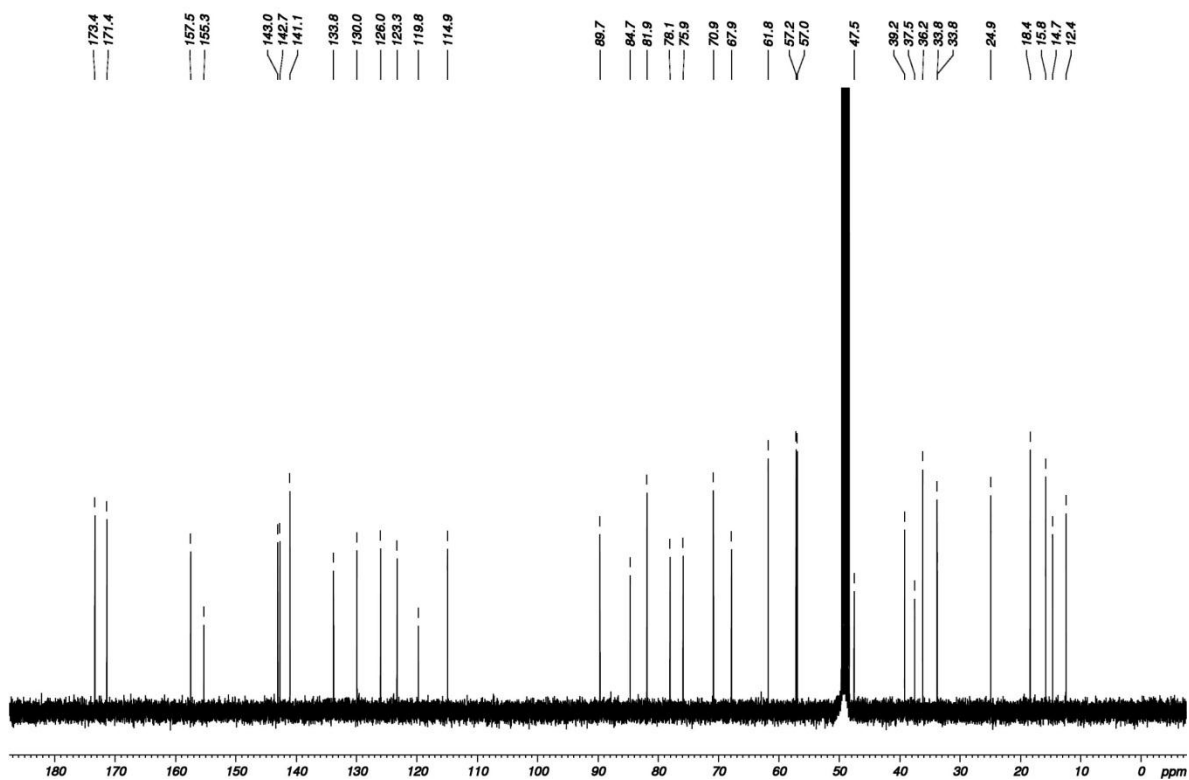
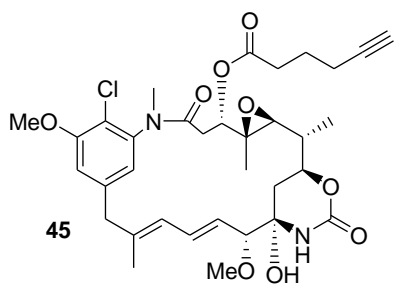


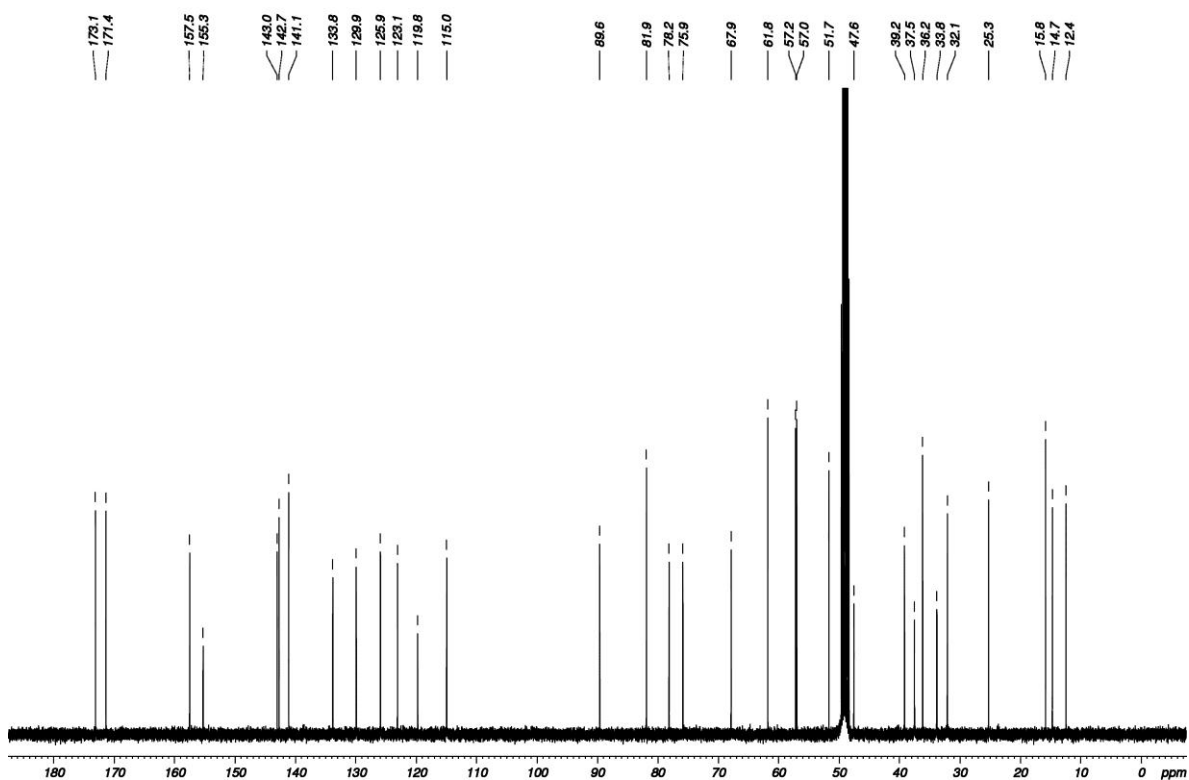
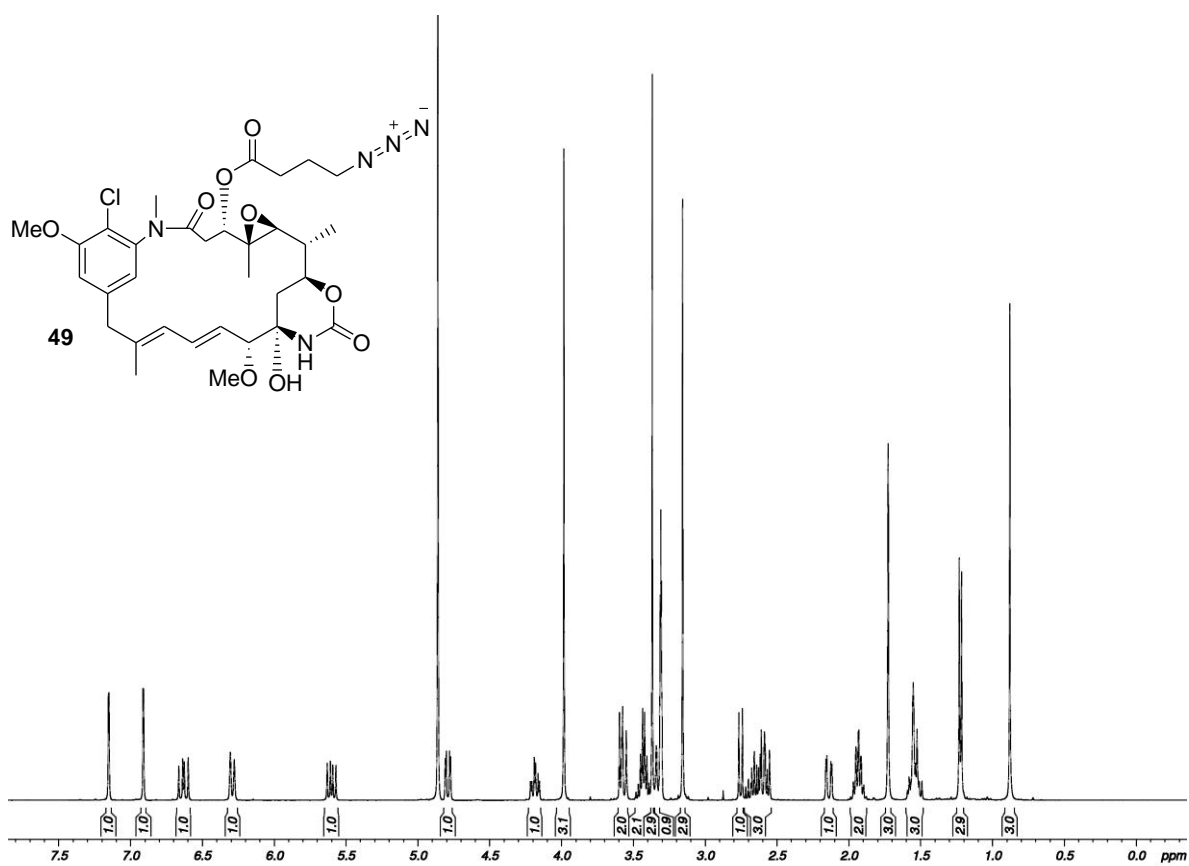


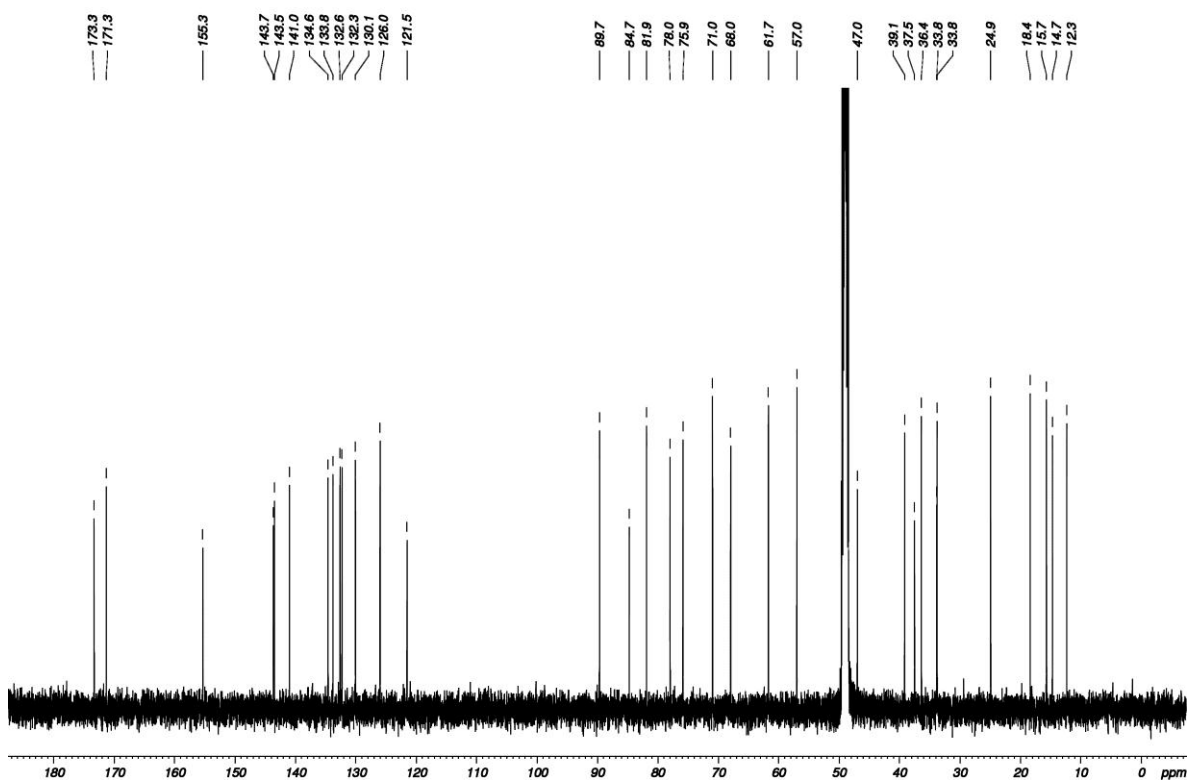
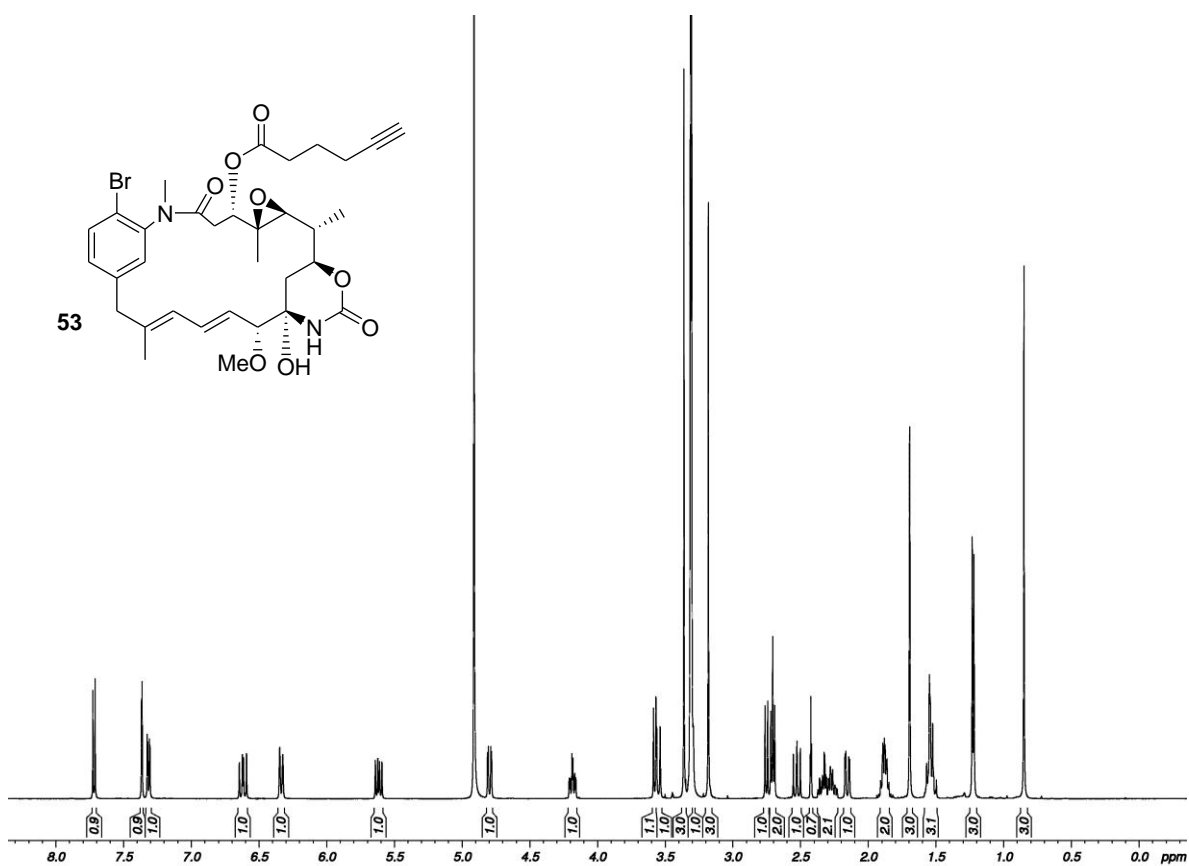


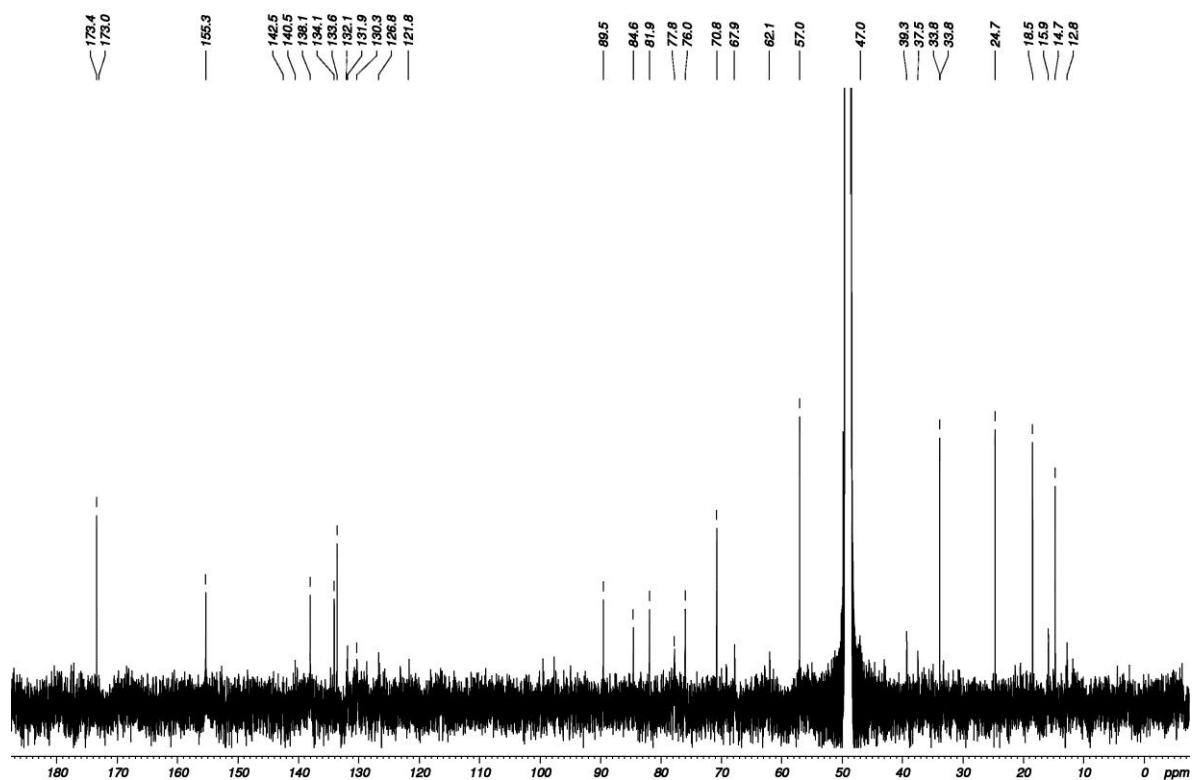
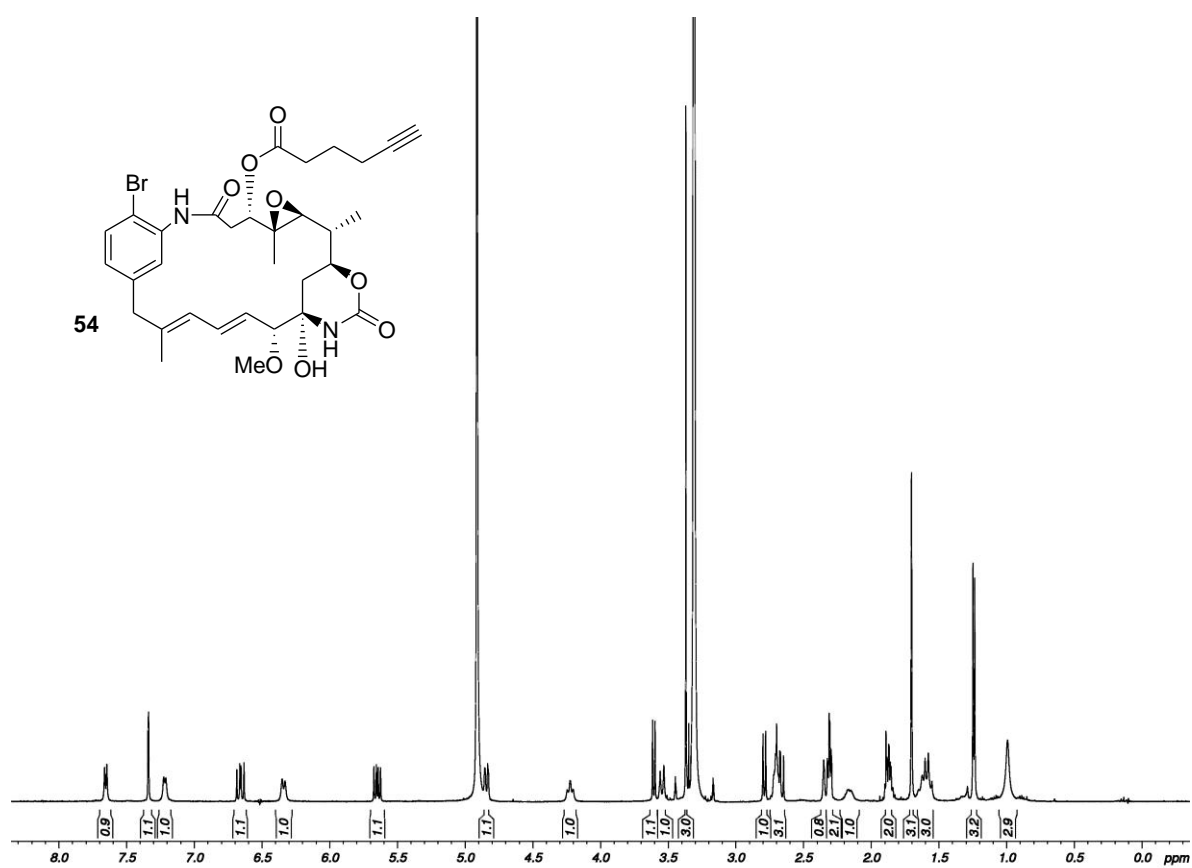


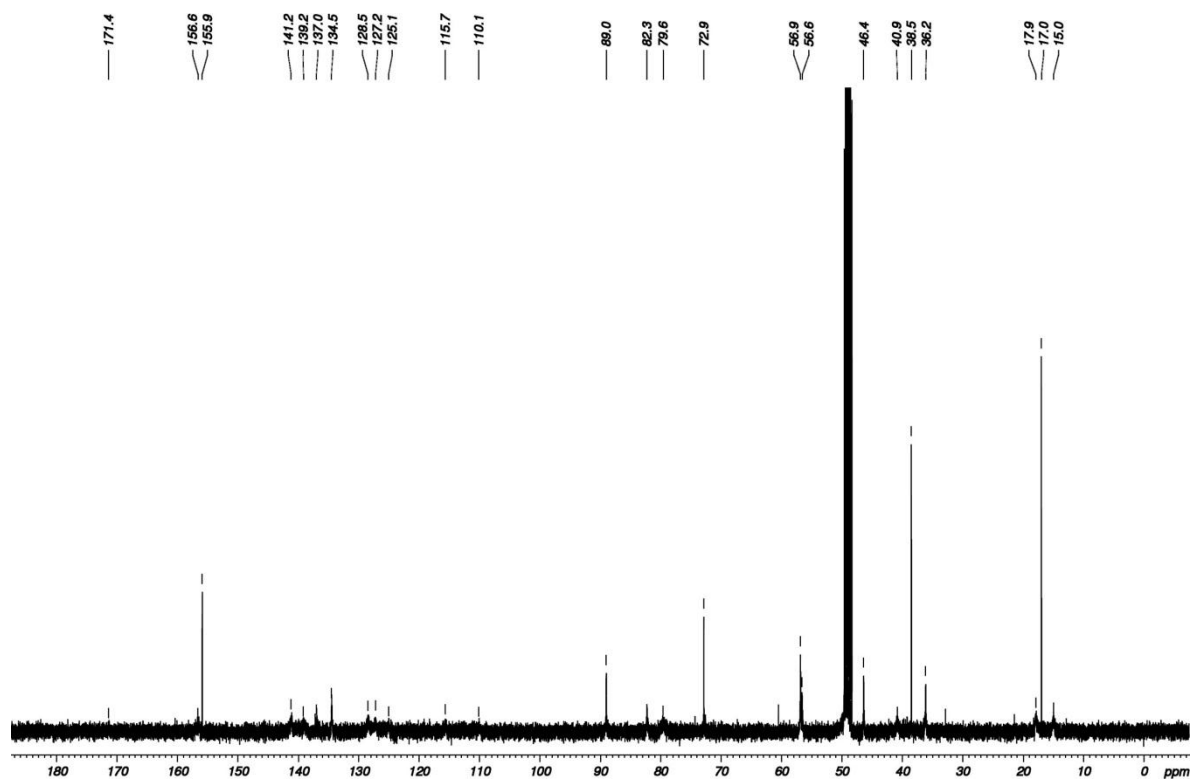
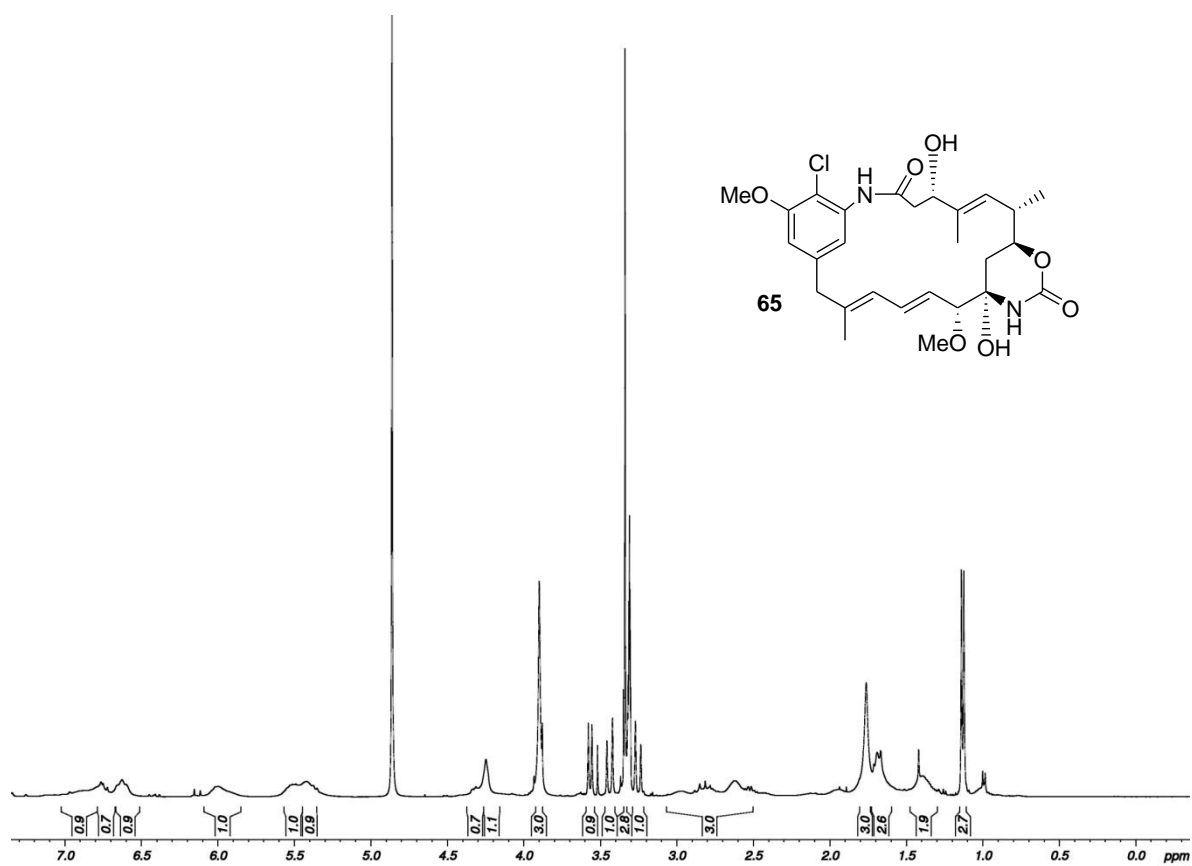


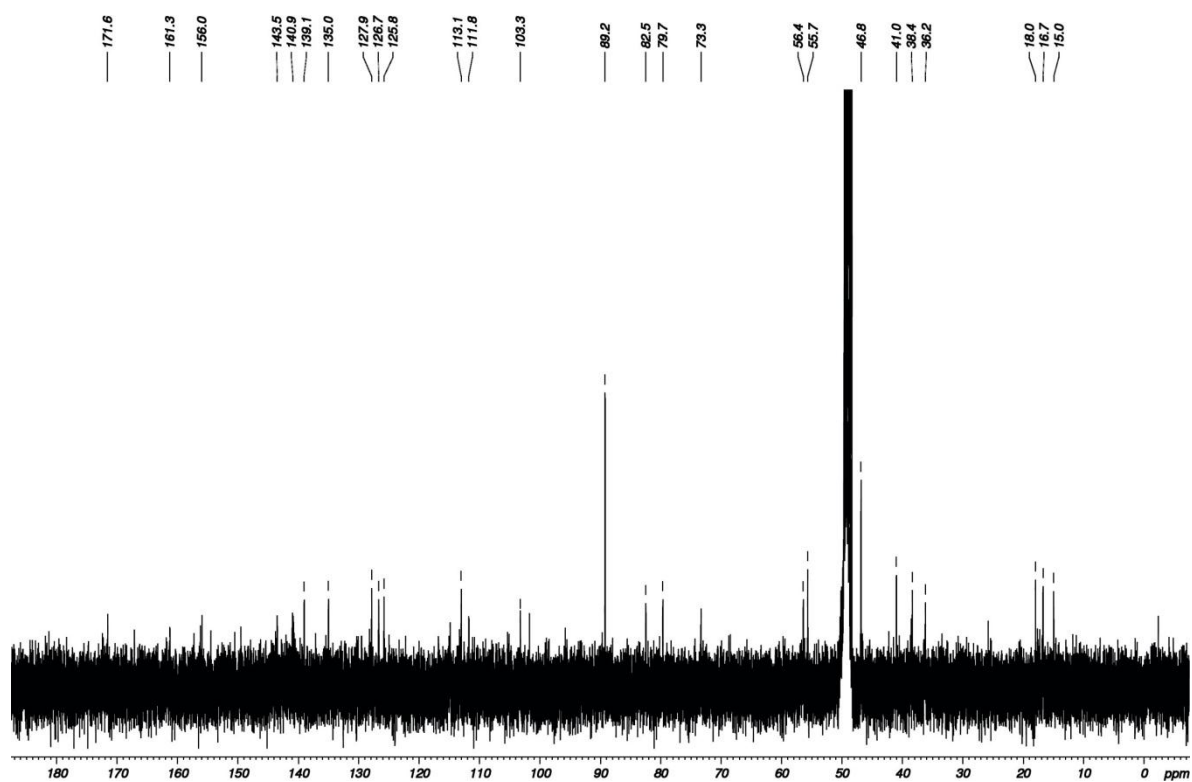
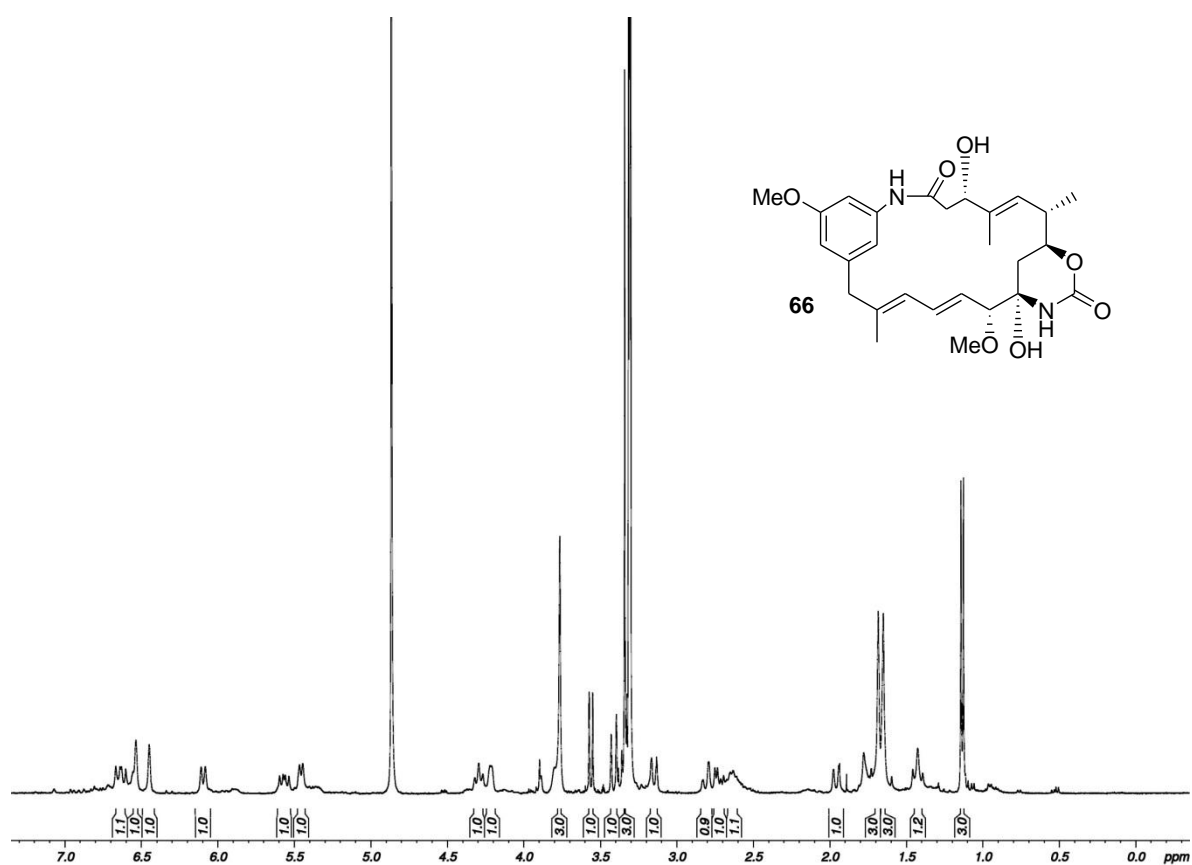


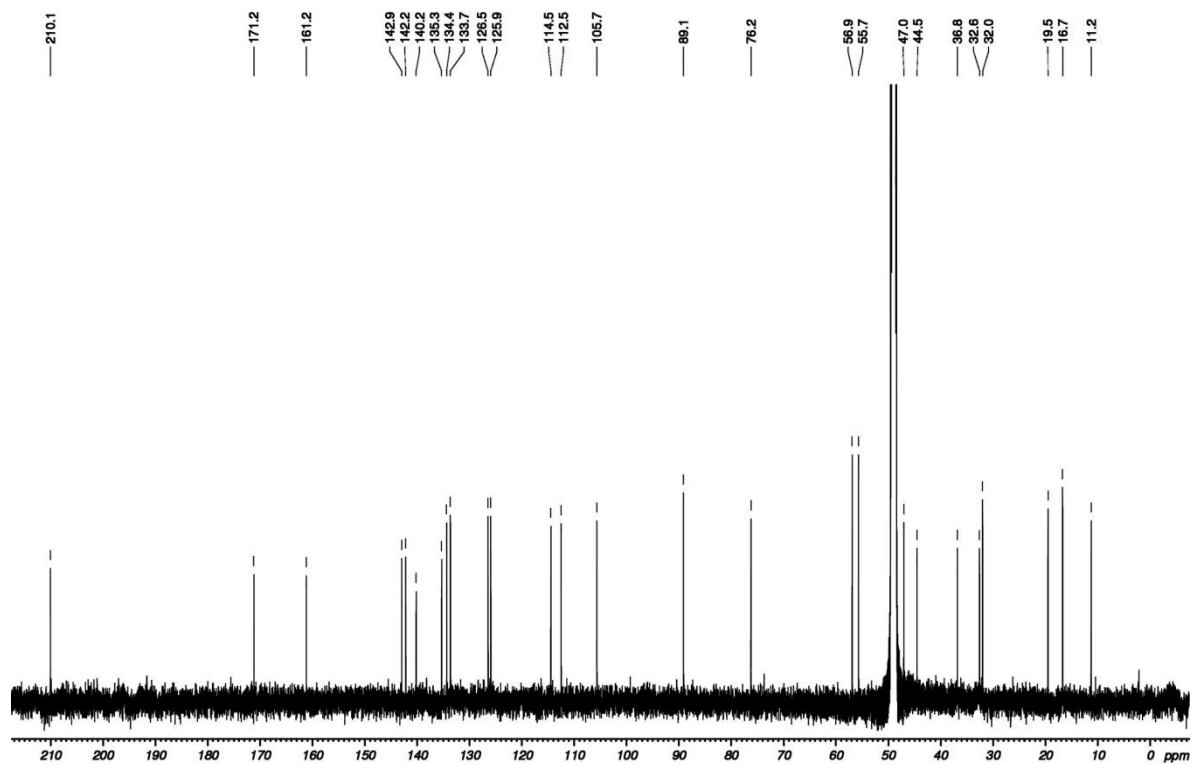
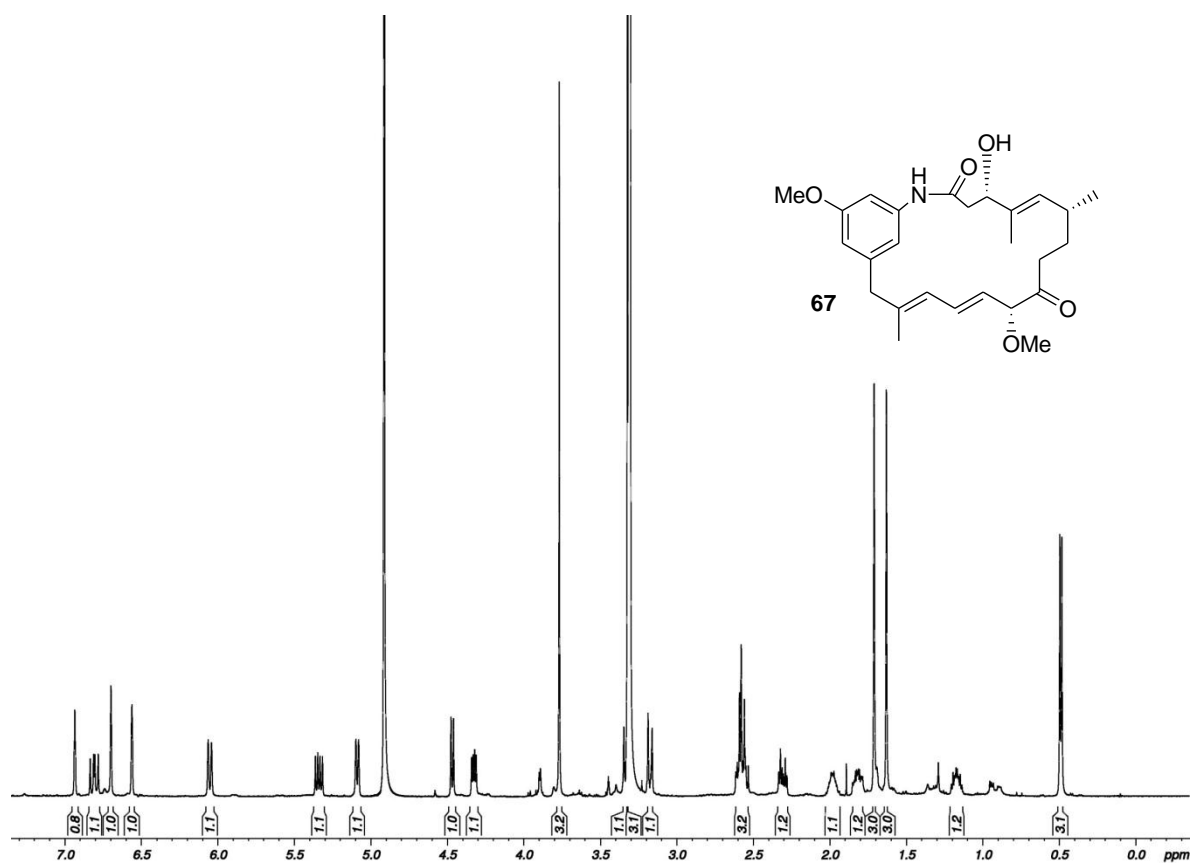


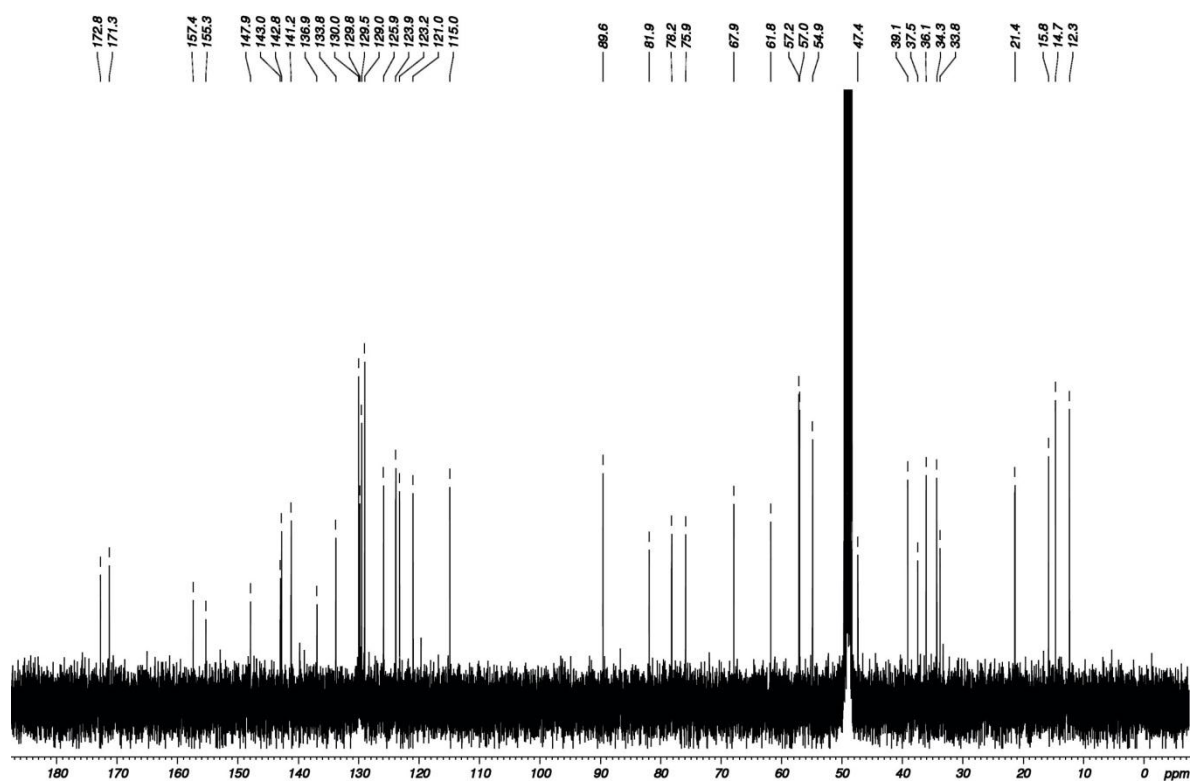
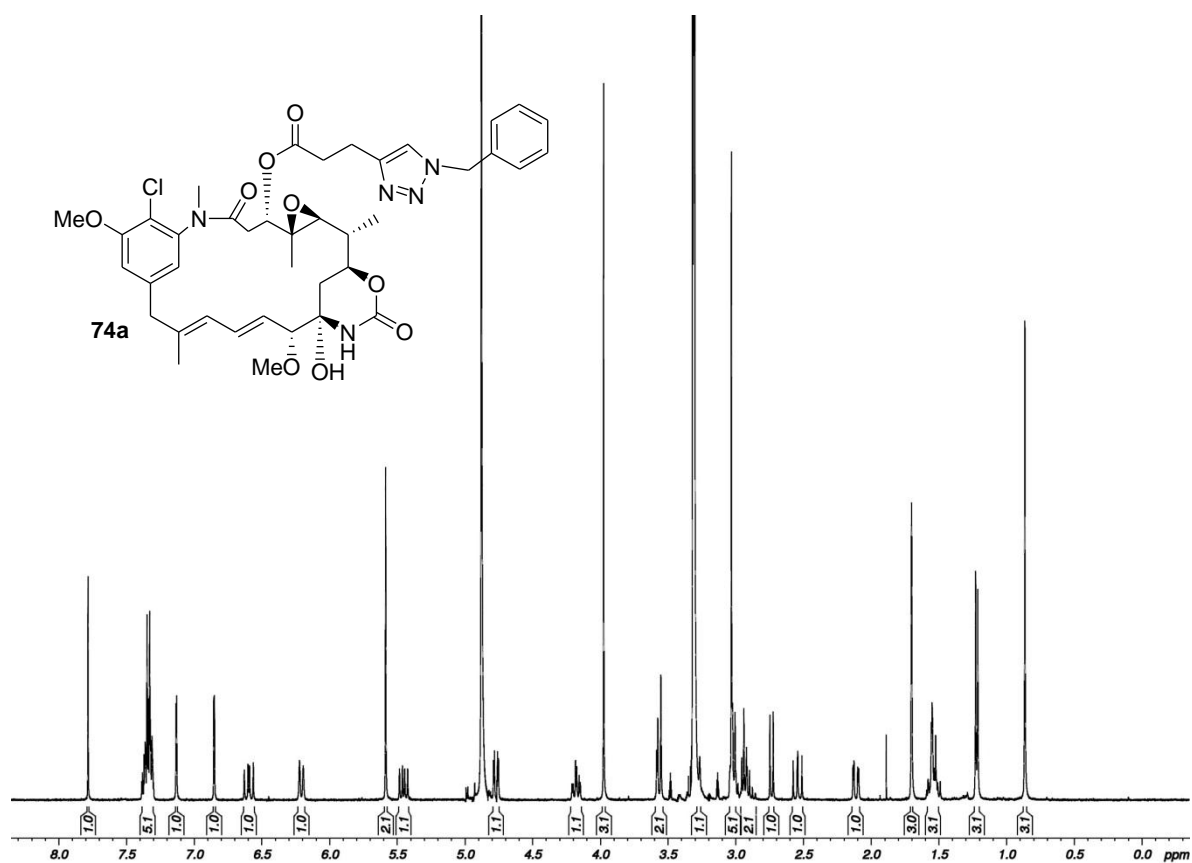


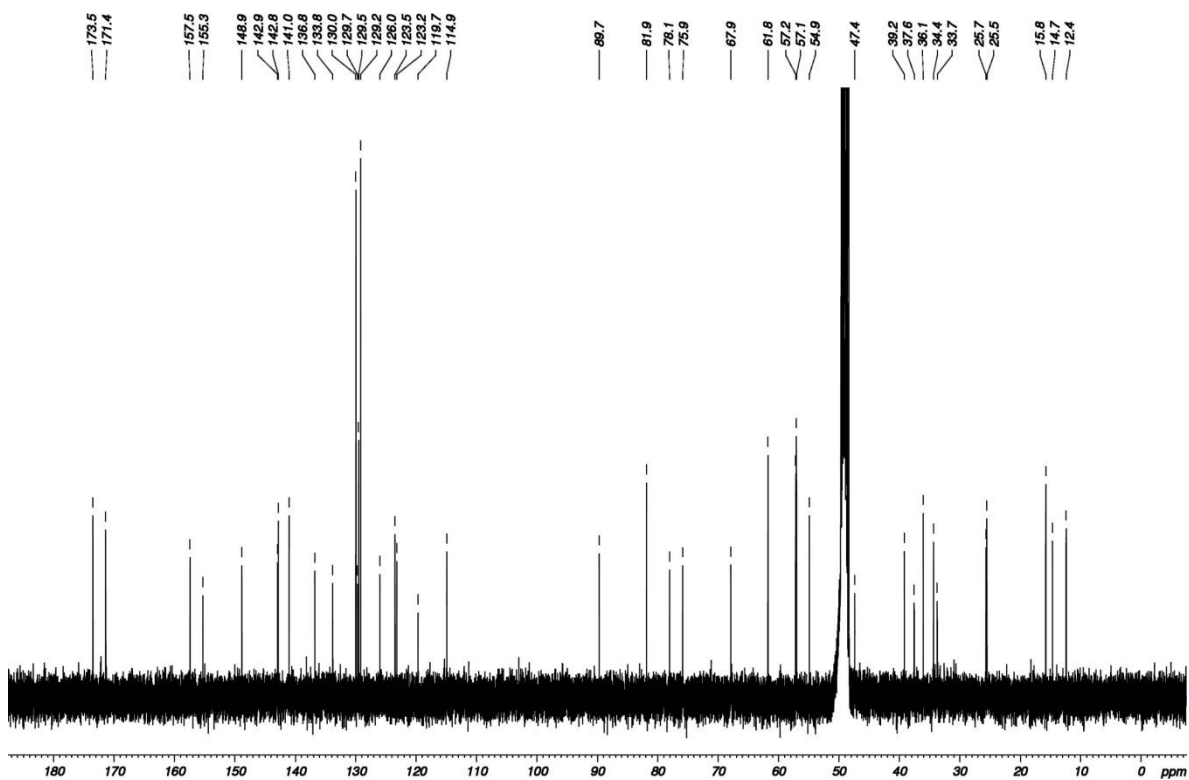
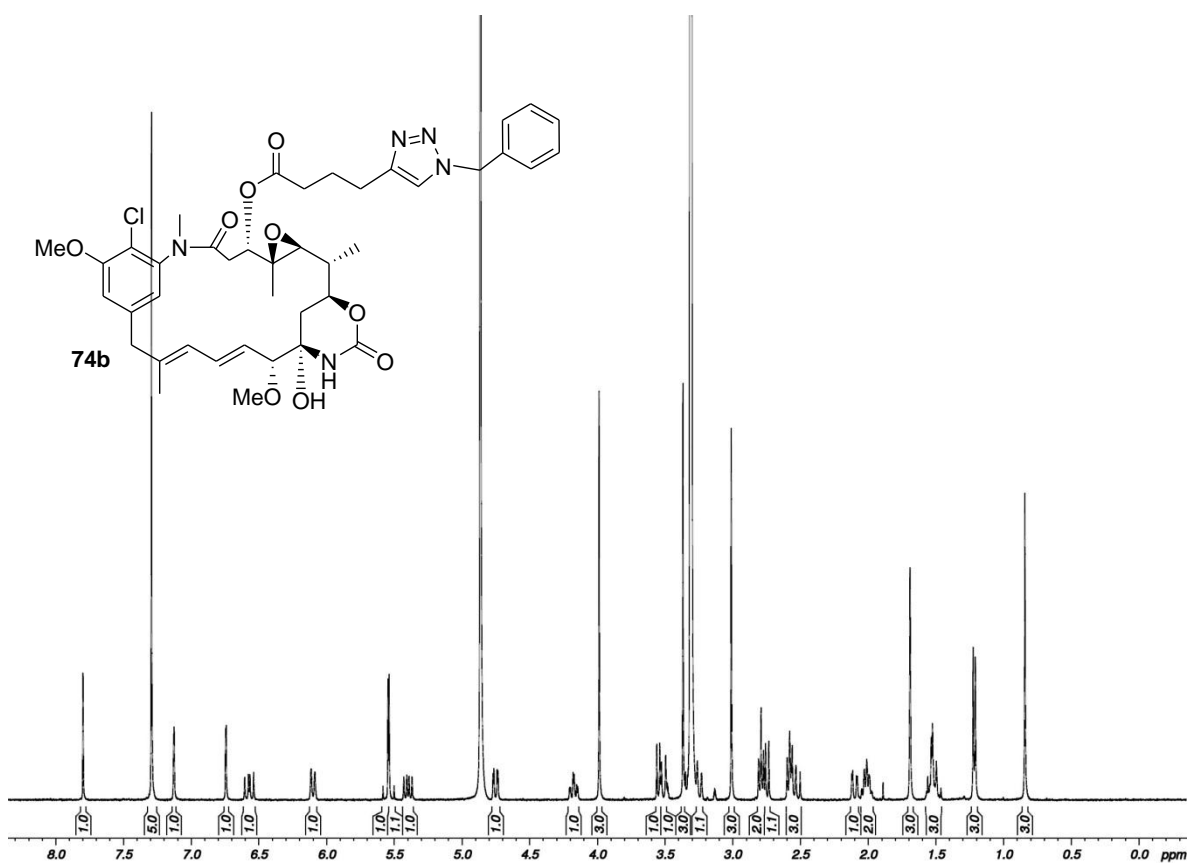


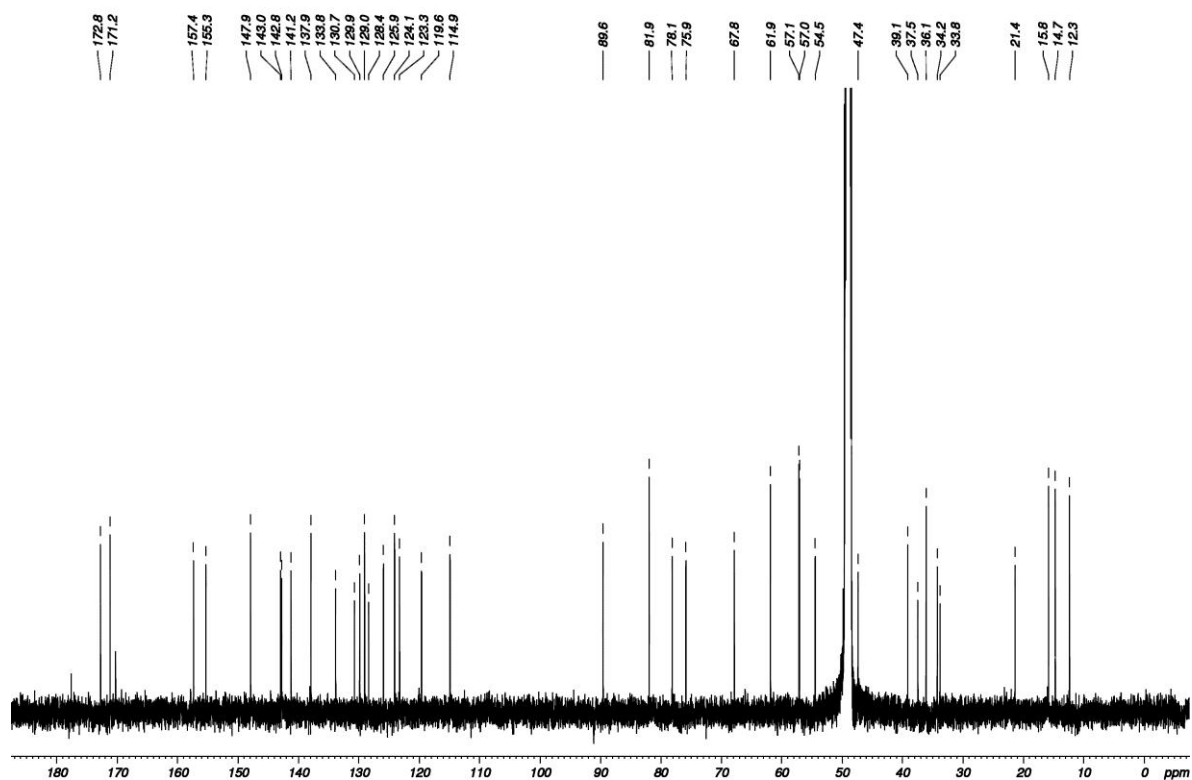
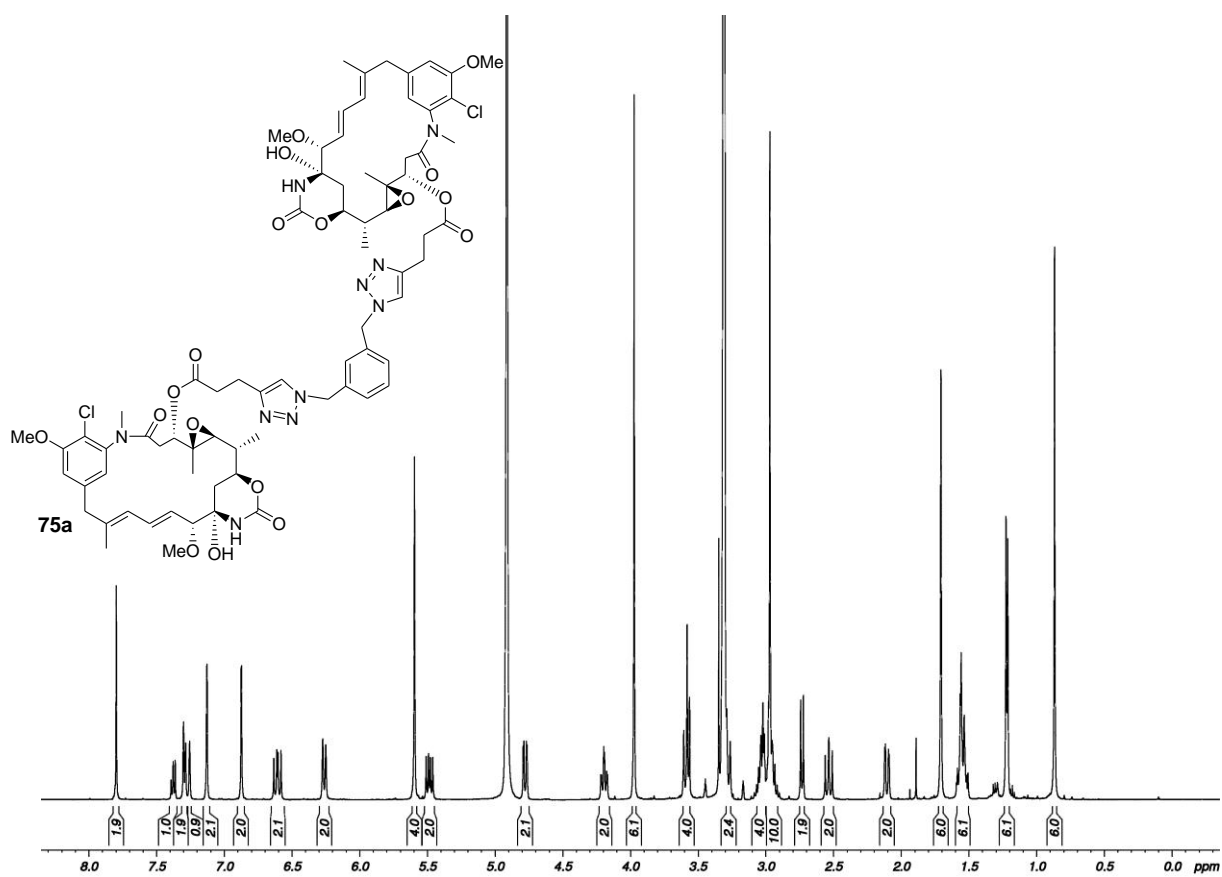


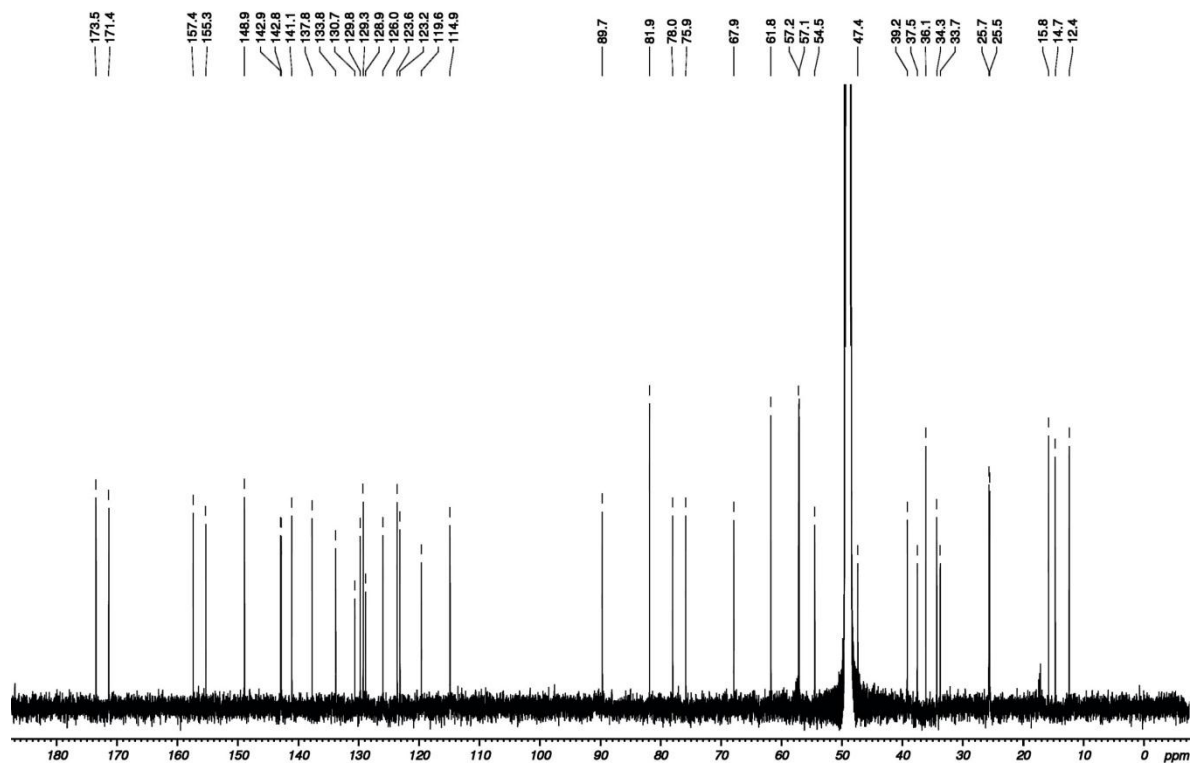
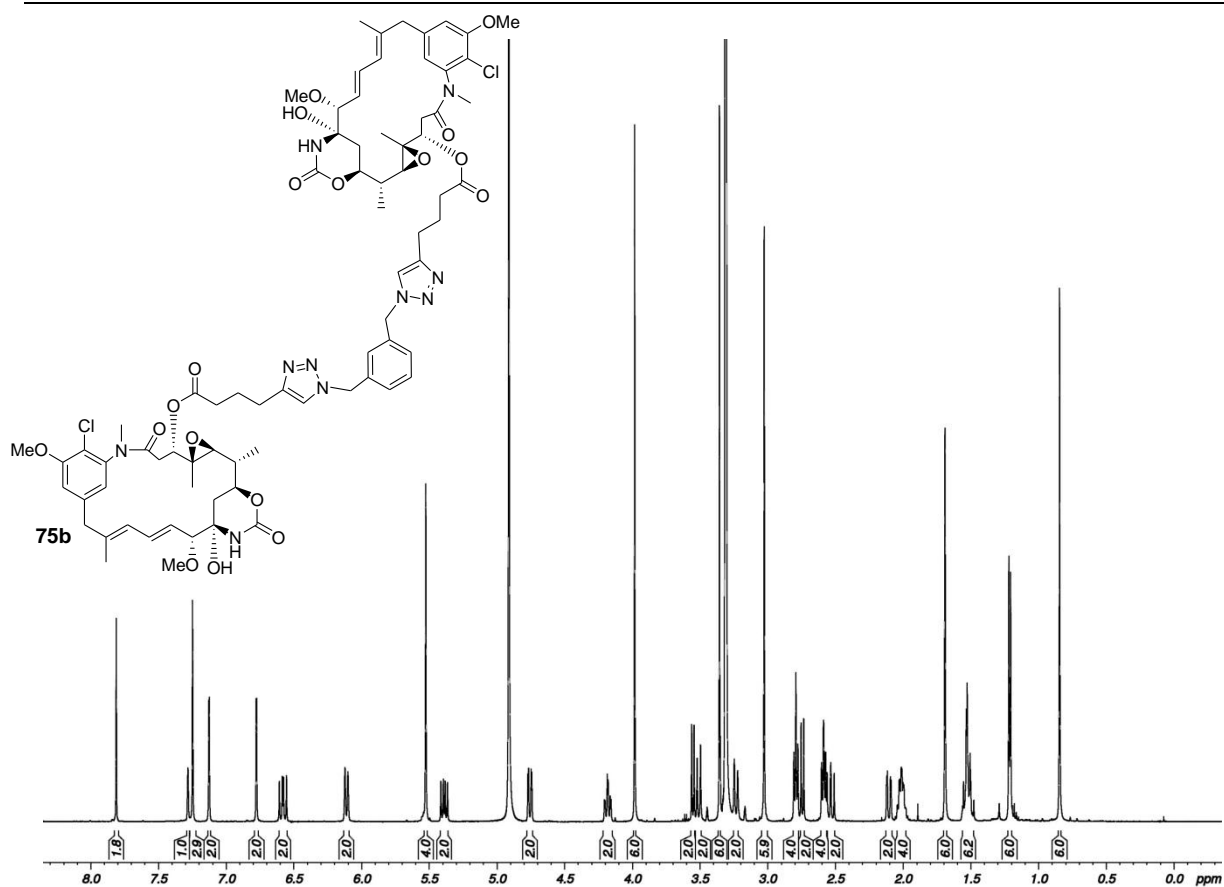


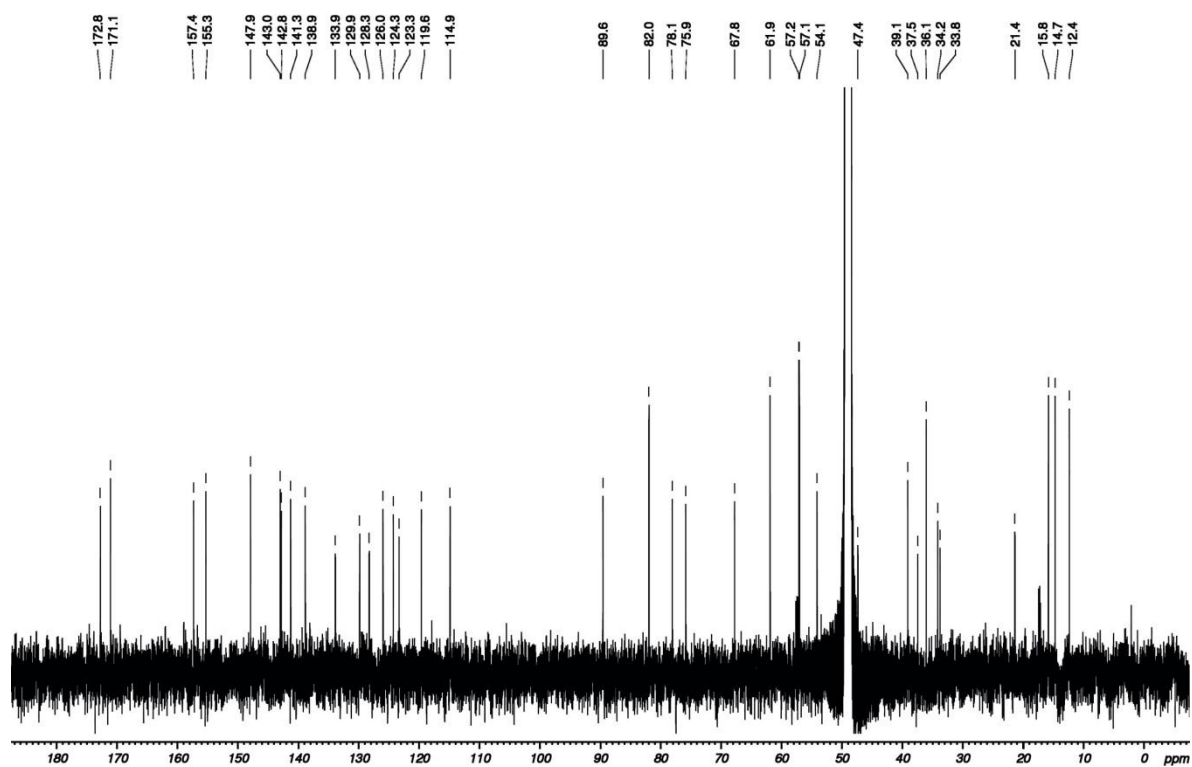
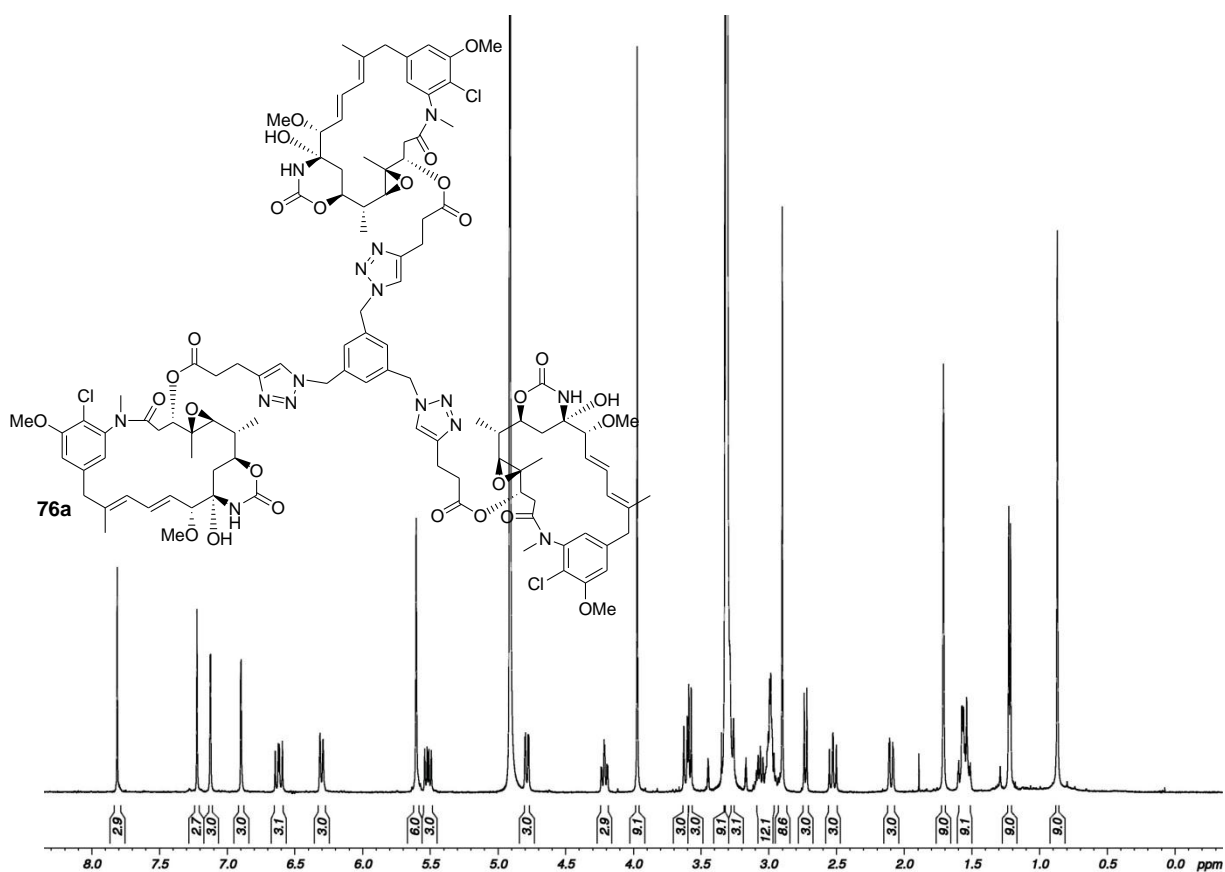


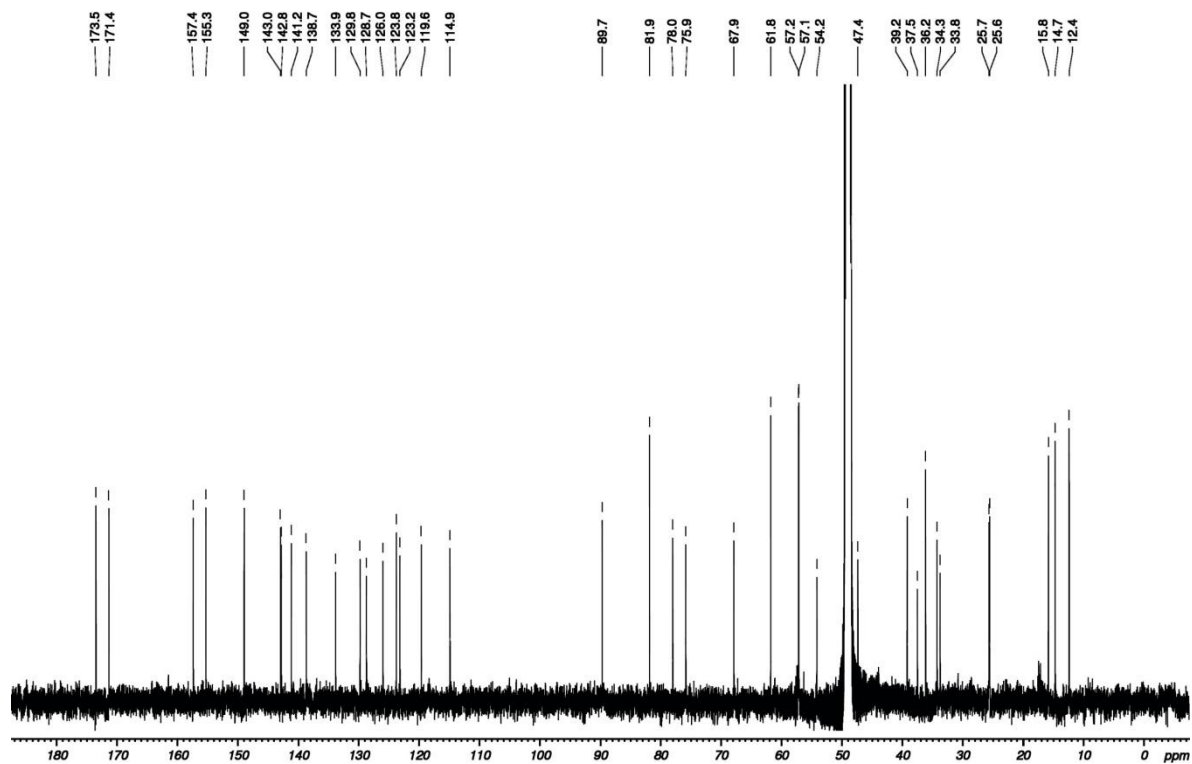
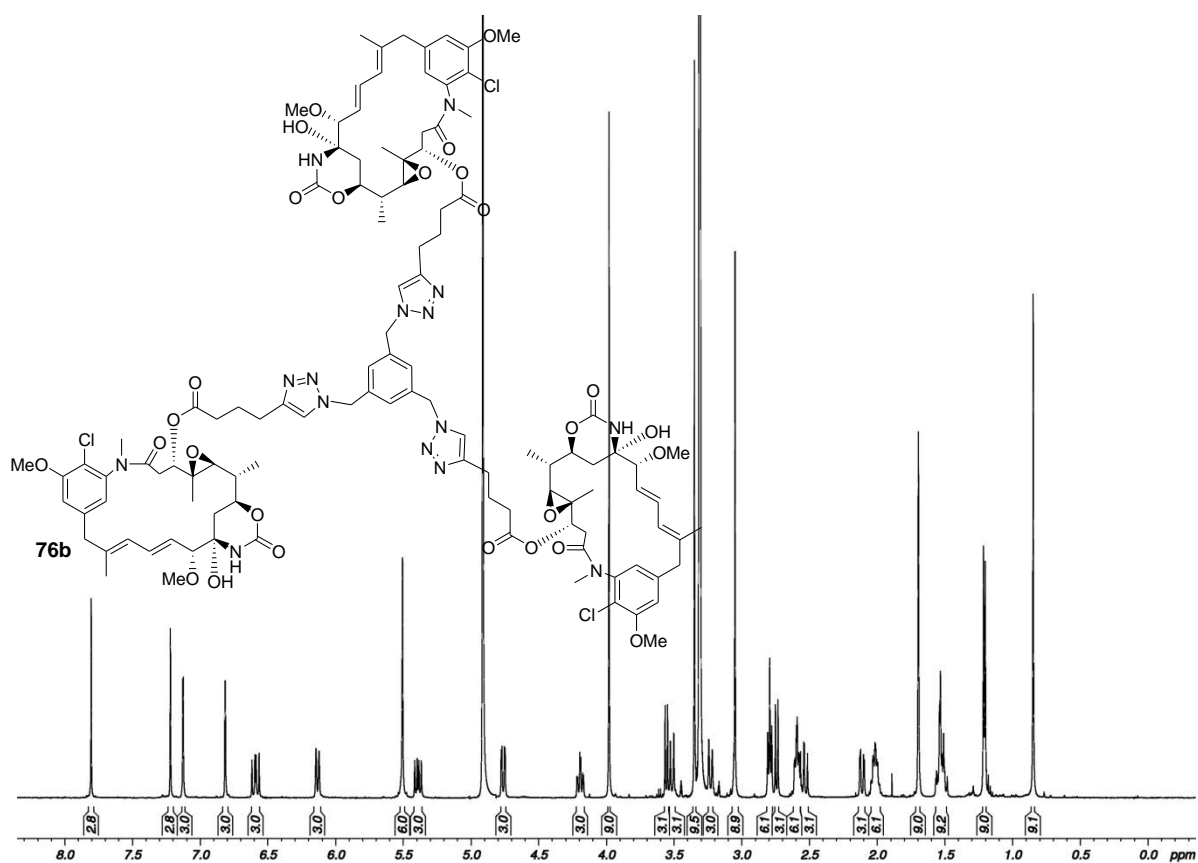


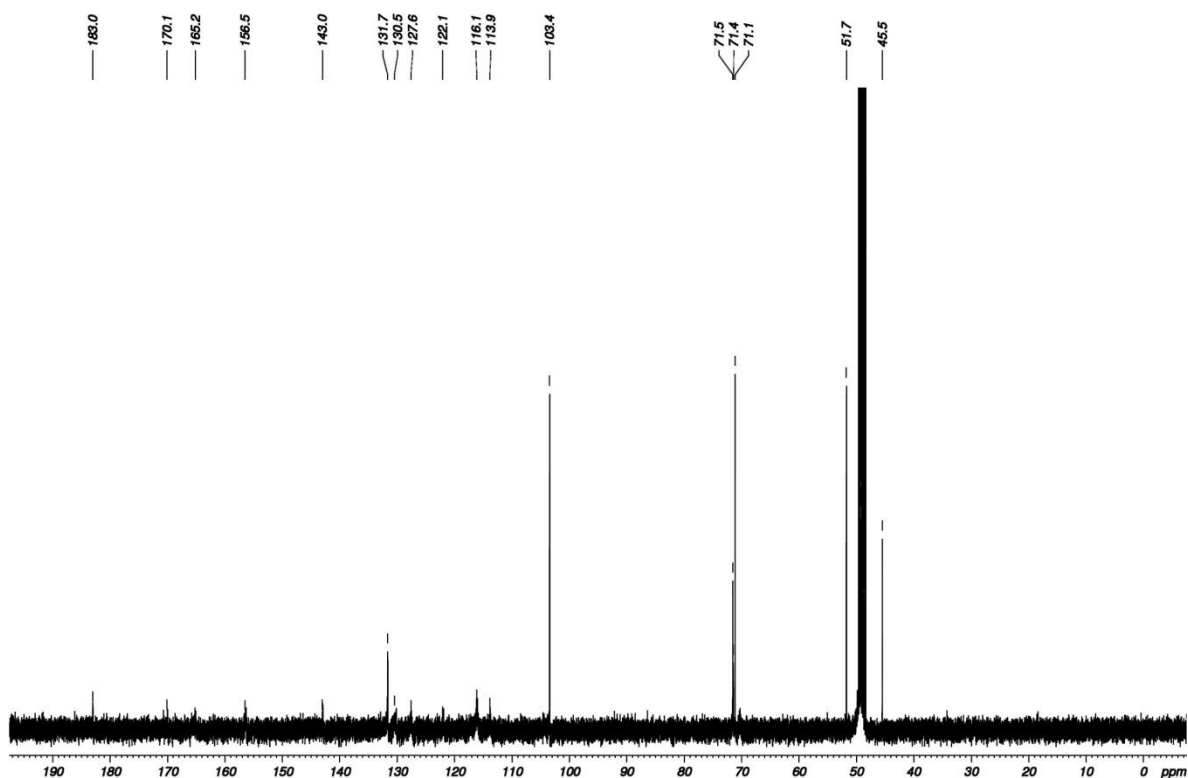
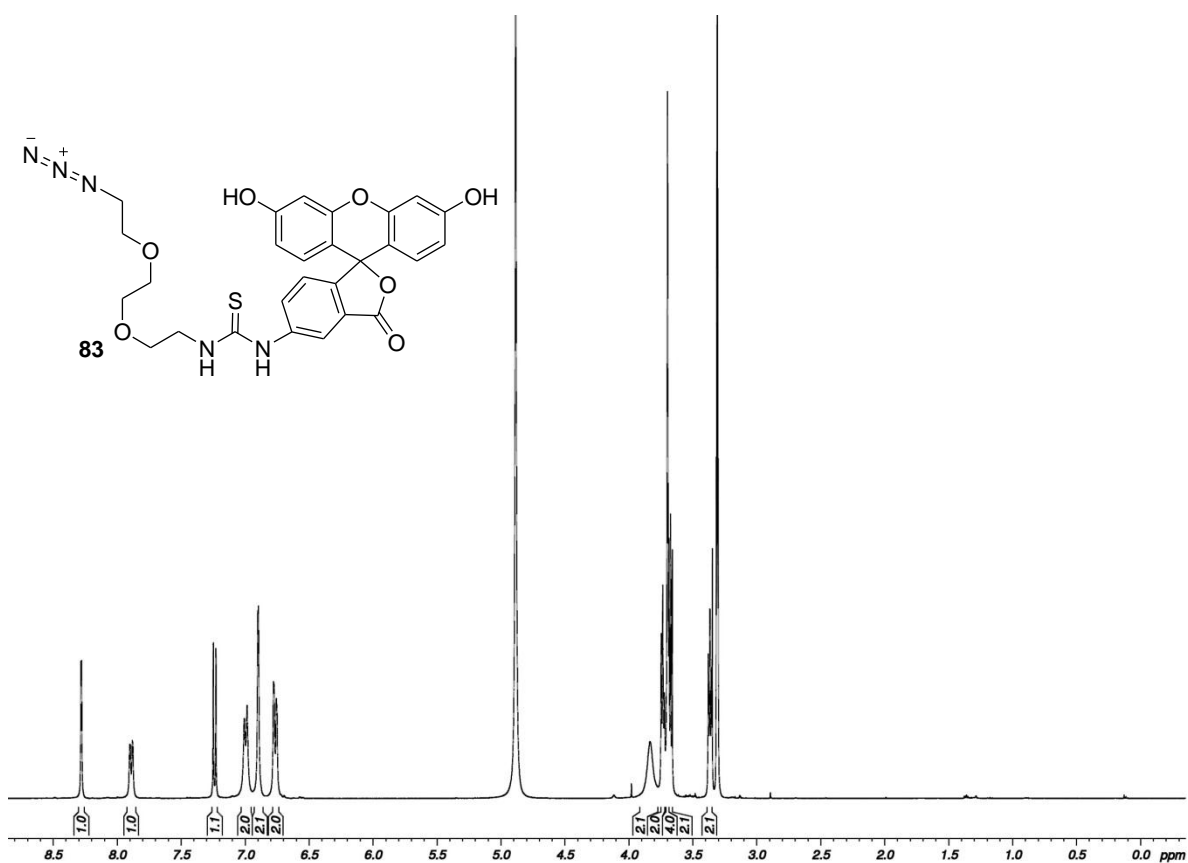


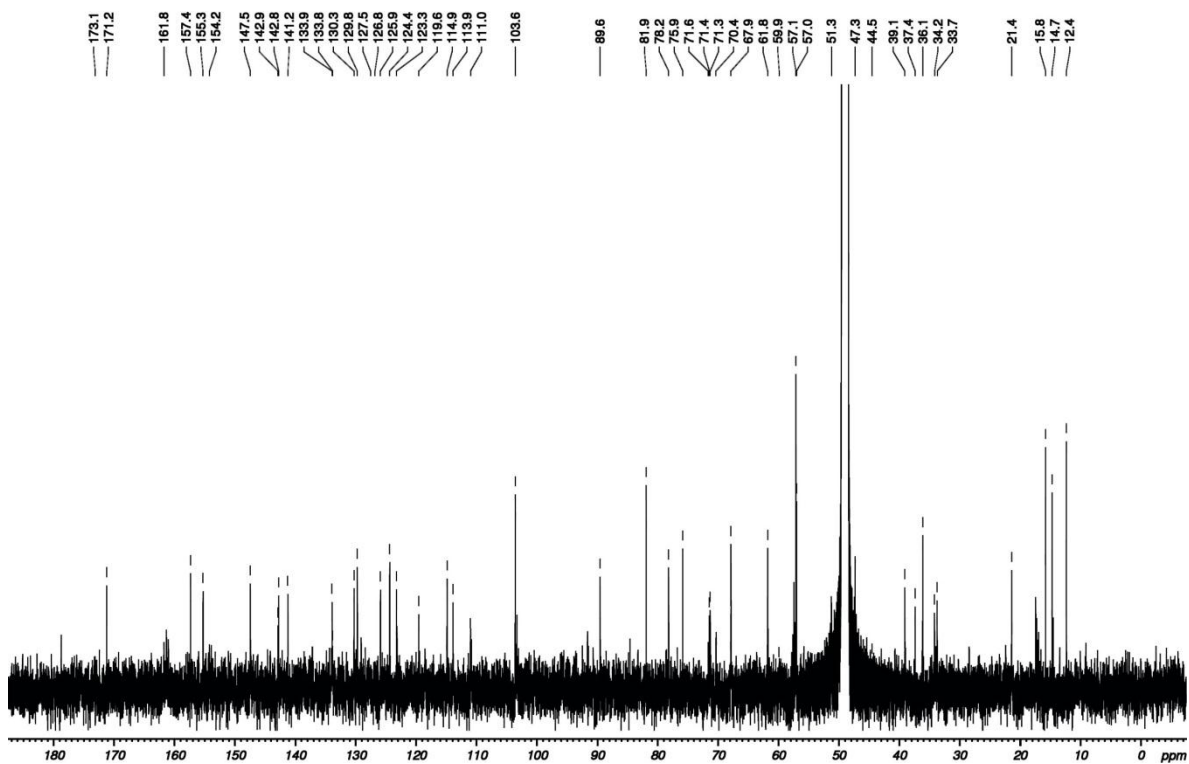
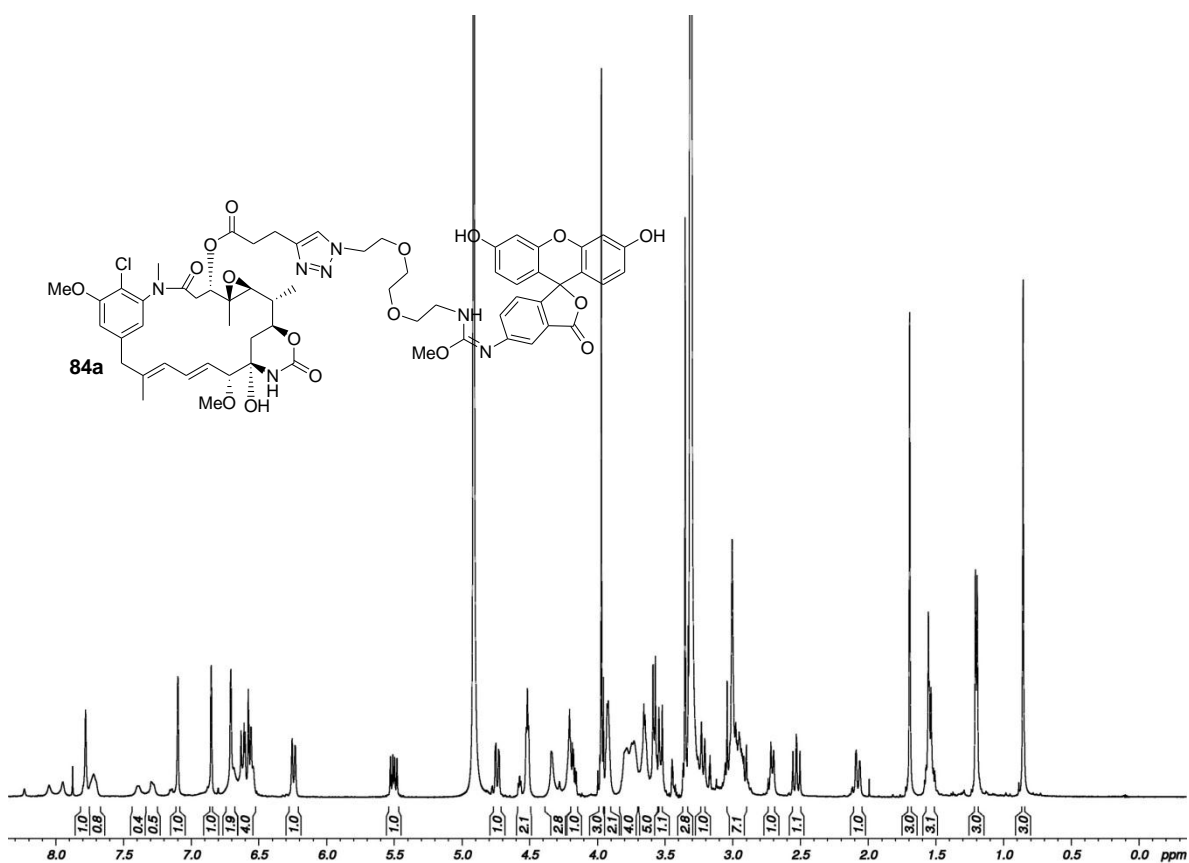


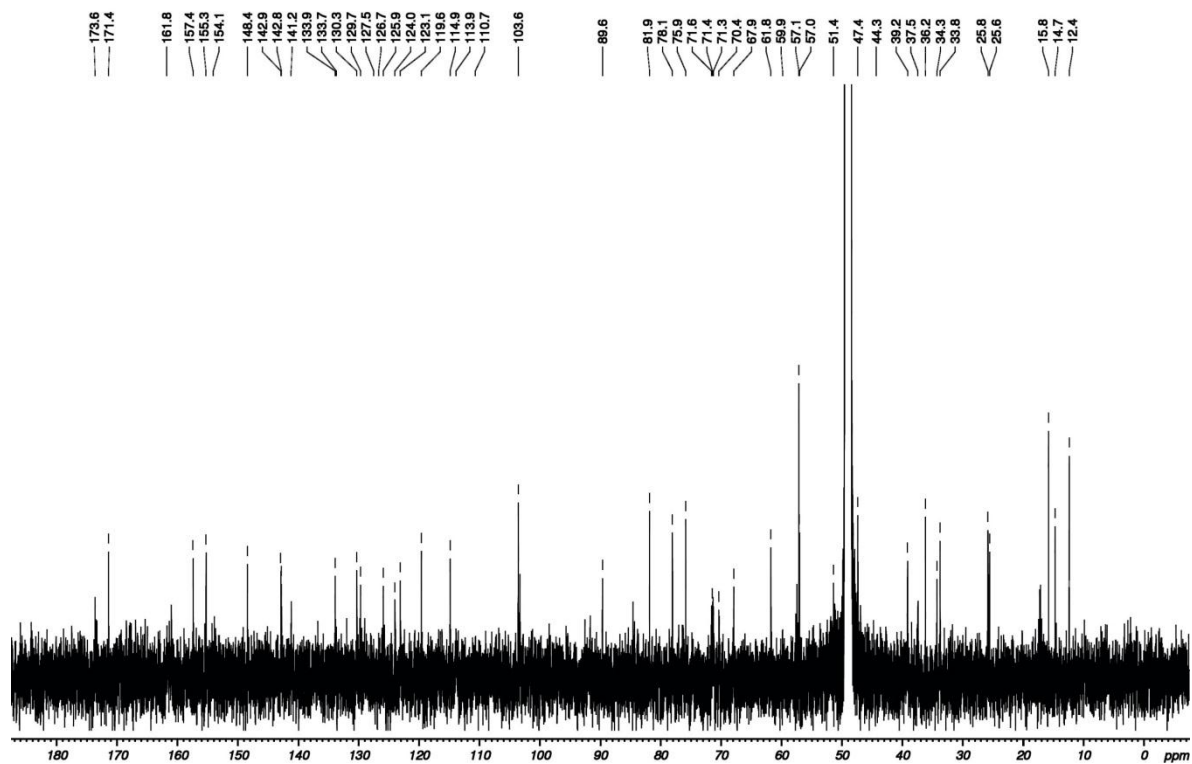
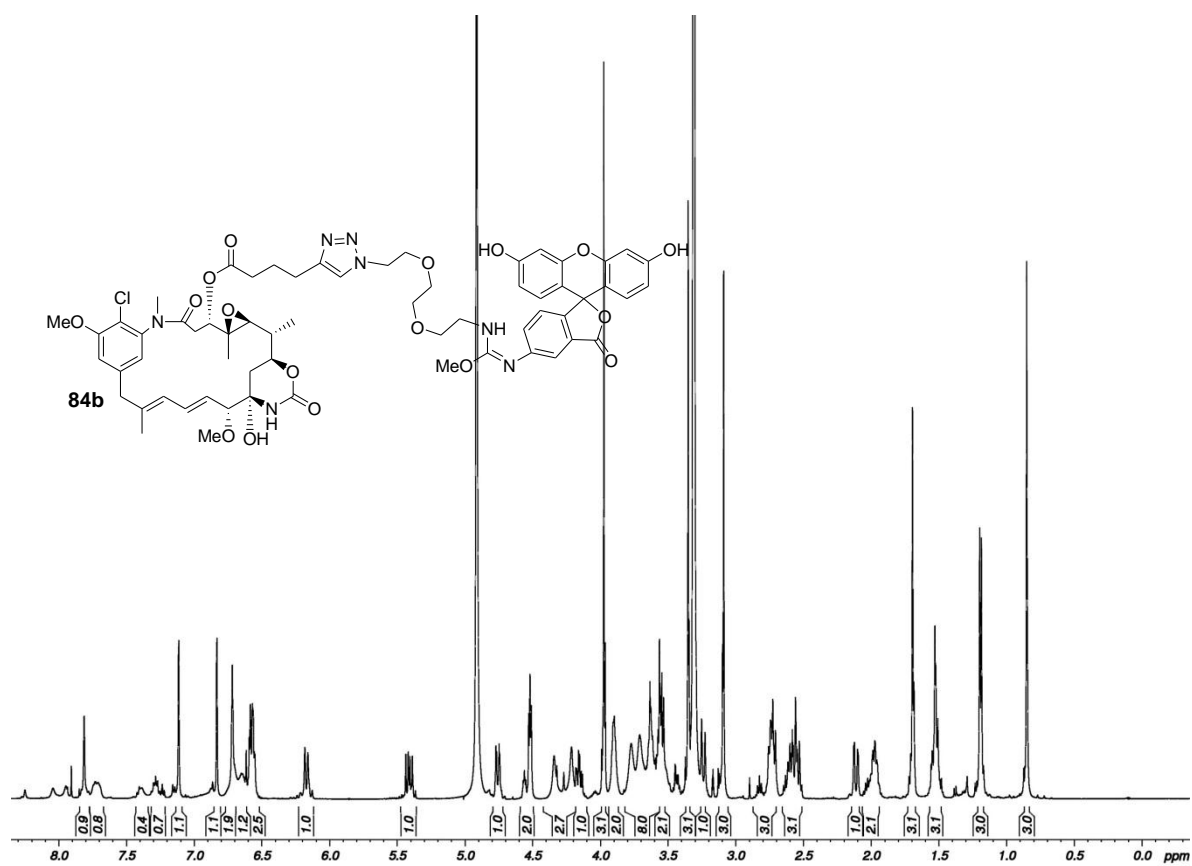












Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Andreas Kirschning für die freundliche Betreuung und maßgebliche Förderung meines wissenschaftlichen Werdegangs. Weiterhin bedanke ich mich für die angenehme Atmosphäre in der Arbeitsgruppe, sowie für die interessante, interdisziplinär geprägte Themenstellung mit der Möglichkeit zu ihrer kreativen Ausgestaltung.

Herrn Prof. Dr. Markus Kalesse danke ich für die Übernahme des Korreferats und für interessante Diskussionen an der biosynthetischen Grenzfläche.

Ebenfalls in diesem Zusammenhang möchte ich besonders Herrn Prof. Dr. Heinz G. Floss danken, dessen wertvolle Einsichten stets konstruktiv zur Weiterentwicklung der Forschungsstränge und zur Manuskriptreife beitrugen.

Herrn Dr. Peter Spiteller danke ich für die Zusendung bestimmter *A. pretiosum*-Mutanten, ohne die es Teile der vorliegenden Arbeit nicht gegeben hätte.

Eine besondere Erwähnung gebührt Dr. Gerald Dräger, dessen offenes Ohr, Hilfsbereitschaft, sowie kompetente Beratung auf den Gebieten der HPLC und der Massenspektrometrie maßgeblich zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beitrugen hat.

Unter den Altvorderen des Ansamitocin-Projekts sind besonders Dr. Marco Brünjes und Dr. Axel Meyer hervorzuheben, deren Vorarbeiten den Einstieg in viele Bereiche des Projekts erleichterten.

Den Mutasynthetikern meiner Generation – Dr. Florian Taft, Dr. Kirsten Harmrolfs, Simone Eichner, Anja Heutling, Binia Thomaszewski und Anne Pieper – danke ich für die exzellente Zusammenarbeit und die regen Diskussionen. Im Besonderen möchte ich Dr. Florian Taft danken, der stets für die ausgiebige und kritische Diskussion und anschließende Verwirklichung von neuen Ideen offen war, und mit dem die intensive Zusammenarbeit und Erstellung zahlreicher Manuskripte mir große Freude bereitet hat. Weiterhin danke ich allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern des Arbeitskreises Kirschning, die zur tollen und lebendigen Atmosphäre während und außerhalb der Arbeitszeiten beigetragen haben, und mir stets hilfsbereite Ansprechpartner bei chemischen Fragestellungen waren. Im Speziellen möchte ich mich bei meinen ehemaligen Laborkollegen Yi Su, Anja Heutling, Binia Thomaszewski, Simone Eichner und Dr. Carsten Zeilinger für die tolle Zeit bedanken.

Für hilfreiche Tipps zur Erstellung, sowie für das Korrekturlesen dieser Arbeit danke ich Dr. Monika Vogt, Dr. Kirsten Harmrolfs, Dr. Florian Taft, Sascha Ceylan und Simone Eichner.

Unter meinen Praktikanten sind besonders Manuela Jüstel, Sebastian Roß, Kerstin Klingeberg und Steffen Litschel hervorzuheben, die nicht nur durch synthetische Arbeiten ihren Beitrag geleistet haben, sondern auch menschlich eine Bereicherung des Laboralltags darstellten.

Ich danke den Mitarbeitern der NMR-Abteilung – Dr. Edgar Hofer, Dr. Thomas Hackl, Dr. Jörg Fohrer, Dagmar Körtje und Monika Rettstadt – sowie den Mitarbeitern der MS-Abteilung – Rainer Nöthel und Mihail Astratov – für die kompetente Bearbeitung unzähliger Proben.

Den Mitarbeitern des Sekretariats – Monika Griesse, Kristina Struckmeier und Christine Bartetzko – gilt mein Dank für die zur reibungslosen Arbeit nötigen Hilfestellungen und Auskünfte, die oft mit dem richtigen Quentchen humorvollen Pfeffers gewürzt waren.

Im Besonderen gebührt mein Dank meinen Eltern, meiner Familie und meiner wohl schärfsten Kritikerin, die mich während meiner akademischen Laufbahn alle auf ihre ganz eigene Weise unterstützt haben.

Lebenslauf

Tobias Knobloch

Persönliche Daten

Geburtsdatum/-ort 26.03.1982 in Hannover

Familienstand ledig

Staatsangehörigkeit deutsch

Akademischer Werdegang

01/2007-04/2010 **Promotion** bei Prof. Dr. A. Kirschning, Leibniz Universität Hannover: „Studien zur Flexibilität der Ansamitocin-Biosynthese in *Actinosynnema pretiosum*“

03/2006-10/2006 **Masterarbeit** bei Prof. Dr. A. Kirschning, Leibniz Universität Hannover: „Versuche zur Expression des *asm9*-Amidsynthasegens aus *Actinosynnema pretiosum*“, Note: „A – ausgezeichnet“

10/2004-10/2006 **Studium Life Science**, Leibniz Universität Hannover, Abschluss: Master of Science, Gesamtnote: „A – ausgezeichnet“

03/2004-04/2004 **Bachelorarbeit** bei Prof. Dr. Dr. R. G. Berger, Leibniz Universität Hannover: „Lipasen aus Basidiomyceten“, Note: „A – ausgezeichnet“

10/2003-09/2004 **Studium Life Science**, Leibniz Universität Hannover, Abschluss: Bachelor of Science, Gesamtnote: „A – ausgezeichnet“

10/2001-09/2003 **Studium Biologie**, Leibniz Universität Hannover, Gesamtnote der Diplom-Vorprüfungen: „sehr gut“

06/2001 **Abitur**, Hannah-Arendt-Gymnasium Barsinghausen, Gesamtnote: 1,4

Auszeichnungen und Stipendien

06/2009 Erster Preis für Vortrag, Konferenz „Chemistry and Biology of Natural Products V“, Bristol, England

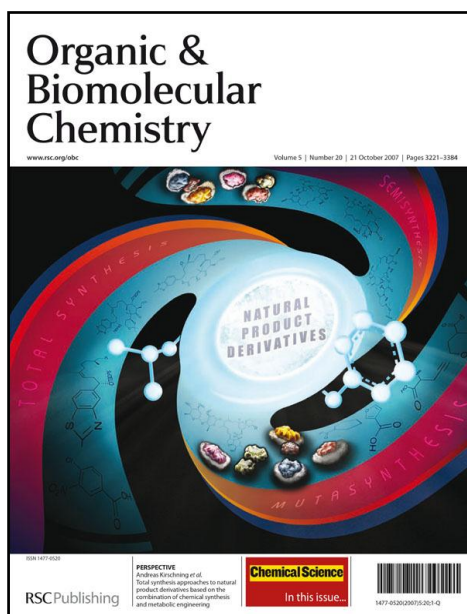
09/2006 IUPAC Posterpreis, Konferenz „Directing Biosynthesis“, Cambridge, England

03/2004-09/2006 Stipendium der Studienstiftung des Deutschen Volkes

12/2003 Christian-Kuhlemann-Preis der Universität Hannover für hervorragende Leistungen in den Diplom-Vorprüfungen

Publikationen

- 1) T. Knobloch, F. Taft, A. Kirschning: „Mutanten können mehr“, *Nachrichten aus der Chemie* **2010**, 58, 23-28.
- 2) F. Taft, M. Brünjes, T. Knobloch, H. G. Floss, A. Kirschning: “Timing of the $\Delta_{10,12}$ - $\Delta_{11,13}$ Double Bond Migration During Ansamitocin Biosynthesis in *Actinosynnema pretiosum*”, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 3812-3813.
- 3) A. Kirschning, K. Harmrolfs and T. Knobloch: “The chemistry and biology of the maytansinoid antitumor agents”, *C. R. Chim.* **2008**, 11, 1523-1543.
- 4) A. Kirschning, F. Taft and T. Knobloch: “Total synthesis approaches to natural product derivatives based on the combination of chemical synthesis and metabolic engineering”, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, 5, 3245-3259. **Titelthema der Ausgabe.**



Wissenschaftliche Vorträge

- 1) T. Knobloch, F. Taft, K. Harmrolfs, M. Brünjes, T. Frenzel, A. Meyer, A. Kirschning: „Exploiting the flexibility in Ansamitocin biosynthesis: From natural to custom-made cytotoxic compounds“, Konferenz „Chemistry and Biology of Natural Products V“ **2009**, 17. Juni, Bristol, England.
- 2) T. Knobloch, F. Taft, K. Harmrolfs, M. Brünjes, T. Frenzel, A. Meyer, A. Kirschning: „Exploiting the flexibility of the biosynthetic machinery of *Actinosynnema pretiosum* leading to the cytotoxic compound Ansamitocin“, Konferenz „2. Naturstoffsymposium“ **2008**, 18. September, Freiburg.